



Diana Salomé Ferreira Machado

Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica

Desenvolvimento de sistemas de libertação de fármaco para aplicação em hipertermia magnética

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia
Biomédica

Orientador: Prof. Doutor João Paulo Miranda Ribeiro Borges, DCM – FCT/UNL

Co - orientador: Mestre Paula Soares, DCM – FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Carla Maria Quintão Pereira;

Arguente: Prof. Doutora Ana Isabel Nobre Martins Aguiar Oliveira Ricardo

Orientador: Prof. Doutor João Paulo Miranda Ribeiro Borges



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Julho, 2015

Diana Salomé Ferreira Machado

Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica

Desenvolvimento de sistemas de libertação de fármaco para aplicação em hipertermia magnética

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia
Biomédica

Orientador: Prof. Doutor João Paulo Miranda Ribeiro Borges, DCM – FCT/UNL

Co-orientador: Mestre Paula Soares, DCM – FCT/UNL

Constituição do Júri:

Presidente: Prof. Doutora Carla Maria Quintão Pereira;

Arguente: Prof. Doutora Ana Isabel Nobre Martins Aguiar Oliveira Ricardo

Orientador: Prof. Doutor João Paulo Miranda Ribeiro Borges

Desenvolvimento de sistemas de libertação de fármaco para aplicação em hipertermia magnética

Copyright © 2015. Todos os direitos reservados. Diana Salomé Ferreira Machado, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

A conclusão deste trabalho é também a conclusão de um ciclo que representa, sem dúvida, os anos mais difíceis mas também melhores da minha vida. Sem as minhas pessoas nada disto teria sido possível, por isso, aqui ficam os meus sinceros agradecimentos a todos vós.

Ao meu orientador, o professor João Paulo Borges, por me ter aceite como aluna e assim me ter permitido desenvolver este trabalho com um tema que tanto interesse me desperta. Obrigada pelo apoio ao longo destes meses, pela disponibilidade, boa disposição, ajuda e por todos os conhecimentos transmitidos.

À Paula Soares, a minha co orientadora, pela orientação, pela ajuda, pela paciência que teve comigo desde o início, pelos conhecimentos que me transmitiu e por sempre me indicar o caminho certo. Um obrigada que se estende à pessoa que és, sempre bem disposta, com uma palavra positiva e uma força extra que, tantas vezes me salvou o dia e me fez continuar a insistir. Obrigada Paula, por tudo!

Ao professor Jorge Silva que, não só disponibilizou o seu laboratório e as suas culturas celulares, como também me orientou e apoiou na realização dos ensaios. Pela paciência que teve a cada contaminação detetada, por me ter permitido a realização de uma das partes deste trabalho e pelo interesse demonstrado no mesmo.

À Ana Isabel, a minha outra força ao longo deste trabalho. Mais do que uma colega de laboratório, foste a amiga que ganhei para a vida. Tens uma força dentro de ti que não fica escondida. Mesmo com as tuas inseguranças, sempre me deste um empurrão para seguir. Foste o meu braço direito neste trabalho. Valeu pelos dias intensos, aquelas 12 horas de trabalho que não acabavam, as noites, os almoços, os cafés... Ai, foram tantos cafés! Muito obrigada Ana!

Aos meus restantes colegas de laboratório de biomateriais, pelo apoio, companhia e boa disposição para animar os dias de trabalho: a Mariana, a Inês, o Francisco, a Luísa e a Tânia. Obrigada também às restantes pessoas do laboratório: a Susete, a Coro, a Augusta, o Carlos João, a Ana Baptista, sempre disponíveis para ajudar, passar os seus conhecimentos e muitas vezes animar.

À minha companheira de curso, colega de casa (vais ficar para sempre com o rótulo) e amiga, Ana Catarina! Desde o primeiro dia que contei contigo e hoje isso ainda não mudou. És o exemplo da força, da persistência, dedicação mas também o exemplo do que é ajudar e saber estar sempre presente. És em muito igual a mim, não sei se é por isso mas gosto muito de ti Cata, obrigada por tudo! Um bem-haja à nossa praceta, à Paixão e à Besuga, ao miminho, por tudo aquilo que passamos naquela casa, obrigada!

Ao Rémi, o meu francês preferido, pela sua maneira de ser, amizade e por tantos bons momentos ao longo destes anos. Ao Morais, o colega de grupo, o amigo a quem se liga nas vésperas dos testes e sabe que vai sempre correr tudo bem. Aos cool: Fábio, Queirós, Inês, Sara, Carolina, Joana, Jonny, Rodrigo, Ricardo e Mateus. À Filipa Belo, uma descoberta mais tardia no curso mas muito boa, ainda bem que te conheci. E a todos aqueles bio colegas que estiveram presentes ao longo destes anos. Um bio obrigada!

Aos meus amigos da terrinha: a Maria, a Elsa, a Cris, o Carlos, o Tiago, a Sara, a Su. À Iolanda e a Mariana, as verdadeiras, as Mulheres do norte, as amigas da vida, que me enchem tanto o coração e mesmo à distância, nunca deixaram de estar tão presentes!

À minha família, a verdadeira, a barulhenta, a grande, a minha!

Aos meus pais. Aquele obrigada do fundo do coração pelos valores que me transmitiram, pelos sacrifícios que fizeram por mim, pela compreensão, pelas pessoas que são, pelo exemplo de vida, porque nunca desistiram e nunca me deixaram desistir. Por me terem deixado fugir para tão longe e mesmo assim estarem tão presentes. Sem vocês nada disto seria possível. Espero poder agradecer-vos a vida toda! Obrigada mãe, obrigada pai.

À minha irmã, aquela que eu não escolhi mas está feita à medida. É a minha amiga da vida. É aquela que está sempre, sempre. Aquela a quem eu ligava a chorar e queria fazer 300 kms, só para me dar um abraço. Aquela que me irá buscar, sempre que eu quiser não estar ali, sem horários, sem perguntas, sem julgamentos. Aquela que pode ter a vida ao contrário, que vai estar lá para mim à mesma. Pelo exemplo que é para mim, de força, de vontade, de empenho. Gosto tanto de ti mana, obrigada! Obrigada pelo afilhado que me deste. E obrigada a ti, Salvador, por seres tão pequenino e já me ajudares tanto, seres tão especial. A tua existência é uma força extra para a minha luta! Obrigada ao meu cunhado, sempre pronto para tudo e disposto a ajudar. Um exemplo de força e motivação.

Obrigada à João e ao Tozé pelo apoio que me têm dado, pela bondade e pelas pessoas que são.

E finalmente, um obrigada à minha pessoa, à minha descoberta da vida, o meu mais que tudo, o meu companheiro, amigo, a minha força de todos os dias, o meu ombro, a minha motivação! Obrigada Nini. Quando estás lá é tudo mais fácil, é tudo melhor... Obrigada pela pessoa que és, pelos milhentos chocolates que já me ofereceste para me ver feliz, pelas tuas músicas, pelas conversas intermináveis, pelas lágrimas que já me limpaste e pelos momentos em que, até o teu silêncio me aquece o coração. És o meu lado feliz. Obrigada! Um grande, grande obrigada!

Resumo

O cancro, pela sua crescente incidência, tem-se tornado numa das doenças mais preocupantes a nível mundial. A falta de tratamentos totalmente eficazes e os múltiplos efeitos secundários associados aos tratamentos existentes, como a quimioterapia e a radioterapia, têm levado ao aumento da procura de novas e mais eficazes terapias para esta doença. Nos últimos anos o recurso à nanotecnologia para o tratamento do cancro tem sido alvo de diversas investigações.

Neste trabalho é estudada a aplicação de nanopartículas magnéticas (mNPs) de óxido de ferro, Fe_3O_4 , em hipertermia magnética e em estudos de libertação da doxorrubicina (Dox), fármaco comumente utilizado em quimioterapia. As nanopartículas magnéticas foram sintetizadas pelo método de precipitação química e foi estudado o efeito da adição de dois tensioativos, o citrato de sódio (CT) e o ácido oleico (AO), assim como do revestimento com quitosano (Cs) e do processo de liofilização. Foram realizados ensaios de citotoxicidade em duas culturas celulares diferentes que apontam para um efeito positivo do Cs na viabilidade celular.

Estas nanopartículas foram aplicadas em estudos de encapsulamento e libertação de fármaco em meios com três pH diferentes. Verificou-se que a libertação é dependente do pH, sendo mais elevada em meios com pH mais ácido. Estes resultados revelam-se de grande interesse no tratamento do cancro, pela existência de uma maior libertação de fármaco em meios extracelulares tumorais (pH 6,5) e nos endossomas e lisossomas (pH 4,5), comparativamente à sua libertação na corrente sanguínea (pH 7,4).

Os ensaios de hipertermia magnética realizados permitiram o cálculo da taxa de absorção específica (*SAR*) e da perda de potência intrínseca (*ILP*) das mNPs, indicadores da capacidade que estas têm de gerar calor na presença de um campo magnético externo. Os resultados indicam

uma diminuição desta capacidade na presença do Cs, dos tensioativos, especialmente o AO, e do processo de liofilização.

Este trabalho revela a aplicabilidade das mNPs em sistemas de liberação de fármacos, bem como em hipertermia magnética.

Palavras-chave: Doxorrubicina; Hipertermia magnética; Liberação de fármaco; Nanopartículas magnéticas; Quitosano; Tensioativos.

Abstract

Cancer, due to its increasing incidence, has become one of the most concerning diseases at a global scale. The lack of fully effective treatments and the several secondary effects associated to the existing ones, like chemotherapy and radiotherapy, has led to the increased search of new and more effective therapies for this disease. The recourse to nanotechnology in cancer treatment has been the target of multiple researches in the past few years.

This work studied the application of iron oxide magnetic nanoparticles (mNPs), Fe_3O_4 , in magnetic hyperthermia and doxorubicine (Dox) release studies. Dox is a commonly used drug in chemotherapy. Magnetic nanoparticles were synthesized by the chemical precipitation method and the addition effect of two surfactants, sodium citrate (CT) and oleic acid (AO), was studied, as well as the mNPs coating with chitosan (Cs) and the lyophilization process. The cytotoxicity studies conducted in two different cellular cultures indicate a positive effect of Cs in cellular viability.

These nanoparticles were used in Dox encapsulation and release studies in three different pH mediums. The release was found to depend on the pH and to be higher in mediums with more acidic pH. These results revealed to be of great interest in cancer treatment, for the existence of a higher drug release in extracellular tumoral mediums (pH 6.5) as well as in endosomes and lysosomes (pH 4.5) in comparison its release in the bloodstream (pH 7.4).

The magnetic hyperthermia studies conducted, allowed the mNPs' specific absorption rate (*SAR*) and intrinsic loss power (*ILP*) to be calculated, which are indicators of their capacity to generate heat in the presence of an external magnetic field. The results indicate a decrease of this capacity in the presence of either Cs, surfactants, especially AO, or the lyophilization process.

This work revealed the applicability of mNPs in drug release systems, as well as in magnetic hyperthermia.

Keywords: Chitosan; Doxorubicin; Drug release; Magnetic hyperthermia; Magnetic nanoparticles; Surfactants.

Índice de Matérias

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. OBJETIVOS E ESTRUTURAÇÃO DO TRABALHO	3
2. HIPERTERMIA.....	5
2.1. TIPOS DE HIPERTERMIA.....	5
2.1.1. Hipertermia magnética	6
2.2. CLASSIFICAÇÃO DA HIPERTERMIA	7
2.3. PARÂMETROS DA HIPERTERMIA	7
2.3.1. Efeito da dose térmica, (Thermal Isoeffect dose, TID)	8
2.3.2. Taxa de absorção específica (SAR)	8
2.3.3. Perda de potência intrínseca (ILP)	9
2.4. EFEITOS CELULARES DA HIPERTERMIA.....	9
2.5. NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS EM HIPERTERMIA	10
3. NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS	13
3.1. NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS (MNPs) DE ÓXIDO DE FERRO.....	13
3.2. REVESTIMENTO DAS MNPs.....	15
3.2.1. Ácido Oleico	16
3.2.2. Citrato de sódio	16
3.2.3. Quitosano	17
3.3. NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS COMO SISTEMA DE LIBERTAÇÃO DE FÁRMACOS.....	17
3.4. MÉTODOS DE SÍNTESE DE MNPs.....	19
3.4.1. Precipitação química.....	20
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	21
4.1. DESPOLIMERIZAÇÃO DO QUITOSANO	21
4.1.1. Materiais.....	21

4.1.2.	Procedimento	22
4.1.2.1.	Dissolução do quitosano	22
4.1.2.2.	Fragmentação do quitosano	22
4.1.2.3.	Precipitação do quitosano	22
4.2.	DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DO QUITOSANO POR VISCOSIMETRIA CAPILAR.....	22
4.2.1.	Materiais	22
4.2.2.	Procedimento	23
4.3.	SÍNTESE DE MNPs DE ÓXIDO DE FERRO POR PRECIPITAÇÃO QUÍMICA	23
4.3.1.	Materiais	23
4.3.2.	Procedimento	23
4.4.	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS MNPs	24
4.4.1.	Materiais	24
4.4.2.	Procedimento	24
4.5.	REVESTIMENTO DAS MNPs COM QUITOSANO (Cs).....	25
4.5.1.	Materiais	25
4.5.2.	Procedimento	25
4.6.	ENCAPSULAMENTO DA DOXORRUBICINA (DOX) NAS NPM'S SEM QUITOSANO (Cs)	25
4.6.1.	Materiais	26
4.6.2.	Procedimento	26
4.7.	ENCAPSULAMENTO DA DOXORRUBICINA NAS MNPs COM QUITOSANO (Cs)	26
4.7.1.	Materiais	26
4.7.2.	Procedimento	26
4.8.	ENSAIOS DE LIBERTAÇÃO DA DOXORRUBICINA	27
4.8.1.	Materiais	28
4.8.2.	Procedimento	28
4.8.2.1.	Libertação da Dox nas mNPs sem Cs	28
4.8.2.2.	Libertação da Dox nas mNPs com Cs	29
4.8.2.3.	Libertação da Dox nas mNPs com Cs liofilizadas	29
4.9.	ENSAIOS REALIZADOS EM HIPERTERMIA	29
4.10.	ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	30
4.10.1.	Procedimento	31
4.10.1.1.	Descongelamento das células	31
4.10.1.2.	Sementeira das células nas placas	31
4.10.1.3.	Incorporação das mNPs nas células	31
4.10.1.4.	Determinação da viabilidade celular pelo método da resazurina	31
4.11.	ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE EM HIPERTERMIA	31
4.11.1.	Procedimento	32
4.12.	CARACTERIZAÇÃO DAS MNPs	32
4.12.1.	Espetroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	32

4.12.2.	Análise morfológica por Microscopia Electrónica de Transmissão (TEM)	32
4.12.3.	Análise Termogravimétrica (TGA).....	32
5.	ANÁLISE E DISCUSSÃO DE RESULTADOS	33
5.1.	DESPOLIMERIZAÇÃO DO QUITOSANO (Cs)	33
5.2.	NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE ÓXIDO DE FERRO (MNPs).....	33
5.2.1.	FTIR	35
5.2.2.	TEM.....	37
5.2.3.	TGA	38
5.3.	ENCAPSULAMENTO DO FÁRMACO NAS MNPs	40
5.3.1.	FTIR	42
5.3.2.	TGA	43
5.4.	ENSAIOS DE LIBERTAÇÃO DE FÁRMACO.....	44
5.5.	SAR E ILP DAS MNPs PRODUZIDAS	50
5.6.	CITOTOXICIDADE DAS MNPs	54
5.6.1.	Citotoxicidade celular em hipertermia.....	57
6.	CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS	61
7.	REFERÊNCIAS	65
APÊNDICES		71
A –	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DA DOX LIVRE.....	71
B –	RELAÇÃO ENTRE O PH E A PERCENTAGEM DE LIBERTAÇÃO DE DOX PARA AS MNPs COM CT, AO, Cs E LIOFILIZADAS.....	72

Lista de Figuras

FIGURA 2.1: RELAÇÃO ENTRE A SOBREVIVÊNCIA CELULAR, TEMPERATURA DE HIPERtermIA E TEMPO DE EXPOSIÇÃO. (ADAPTADO DE [4])	8
FIGURA 3.1: ESTRUTURA CRISTALINA DA MAGNETITE. (ADAPTADO DE [32]).....	15
FIGURA 3.2: ESTRUTURA QUÍMICA DA MOLÉCULA DE ÁCIDO OLEICO.....	16
FIGURA 3.3: ESTRUTURA QUÍMICA DO CITRATO DE SÓDIO.....	17
FIGURA 3.4: ESTRUTURA QUÍMICA DO QUITOSANO.....	17
FIGURA 3.5: ESQUEMA REPRESENTATIVO DOS TRÊS DIFERENTES TIPOS DE NANO-ESTRUTURAS EM HIPERtermIA PARA LIBERTAÇÃO DE FÁRMACOS (RETIRADO DE [16]).	18
FIGURA 3.6: ESQUEMA REPRESENTATIVO DOS DOIS TIPOS DE LIBERTAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS EM HIPERtermIA USANDO MNPS.....	19
FIGURA 4.1: ESQUEMA REPRESENTATIVO DA FORMAÇÃO DAS MNPS DE Fe_3O_4 REVESTIDAS POR CS.	25
FIGURA 4.2: ESQUEMA DE ENCAPSULAMENTO DA DOX EM MNPS REVESTIDAS COM CS.	27
FIGURA 4.3: ESQUEMA DOS DIFERENTES COMPONENTES DO EQUIPAMENTO DE HIPERtermIA UTILIZADO: (1) CONTROLADOR (2) APLICADOR; (3) BOMBA DE VÁCUO; (4) <i>CHILLER</i>	30
FIGURA 5.1: ESPECTRO DE FTIR DAS MNPS DE Fe_3O_4 SEM TENSIOATIVO (Fe_3O_4), COM CT (Fe_3O_4 CT) E COM AO (Fe_3O_4 AO).....	35
FIGURA 5.2: ESPECTRO DE FTIR DO CS E DAS DIFERENTES MNPS DE Fe_3O_4 REVESTIDAS COM CS: SEM TENSIOATIVO (CS- Fe_3O_4), COM CT (CS- Fe_3O_4 CT) E COM AO (CS- Fe_3O_4 AO).....	37
FIGURA 5.3: IMAGEM DE TEM PARA AS MNPS DE Fe_3O_4 E RESPECTIVA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS PARTÍCULAS.	38
FIGURA 5.4: TERMOGRAMAS DAS MNPS DE Fe_3O_4 SEM TENSIOATIVO (Fe_3O_4), COM CT (Fe_3O_4 +CT) E COM AO (Fe_3O_4 +AO).....	38

FIGURA 5.5: TERMOGRAMA DO CS E DAS MNPs DE Fe_3O_4 REVESTIDAS COM CS, SEM TENSIOATIVO ($\text{Fe}_3\text{O}_4+\text{CS}$), COM CT ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CT}+\text{CS}$) E COM AO ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-AO}+\text{CS}$)	40
FIGURA 5.6: EFICIÊNCIA DO ENCAPSULAMENTO DO FÁRMACO EM FUNÇÃO DA MASSA PARA AS MNPs S/SURF, COM CT E AO: A) SEM CS, B) COM CS.....	41
FIGURA 5.7: ESPECTRO DE FTIR DA DOX, DAS MNPs DE Fe_3O_4 ENCAPSULADAS COM DOX ($\text{Fe}_3\text{O}_4+\text{DOX}$) E DAS MNPs DE Fe_3O_4 REVESTIDAS COM QUITOSANO E ENCAPSULADAS COM DOX ($\text{Fe}_3\text{O}_4+\text{CS}+\text{DOX}$).....	43
FIGURA 5.8: TERMOGRAMA DAS MNPs REVESTIDAS COM CS ($\text{Fe}_3\text{O}_4+\text{CS}$) E DAS MNPs REVESTIDAS COM CS E COM DOX ENCAPSULADA ($\text{Fe}_3\text{O}_4+\text{CS}+\text{DOX}$).....	44
FIGURA 5.9: LIBERTAÇÃO CUMULATIVA DE A) DOX LIVRE E B) DOX ENCAPSULADA NAS MNPs DE Fe_3O_4 , EM PH 7,4, 6,5 E 4,5, AO LONGO DE 72 HORAS.	46
FIGURA 5.10: LIBERTAÇÃO DA DOX AO LONGO DE 72H PARA AS MNPs SEM TENSIOATIVO (Nps), COM CT (Nps+CT) E COM AO (Nps+AO), EM PH: A) 4,5, B) 6,5, C) 7,4	48
FIGURA 5.11: LIBERTAÇÃO DA DOX AO LONGO DE 72H PARA AS MNPs REVESTIDAS COM CS, SEM TENSIOATIVO (Nps+CS), COM CT (Nps+CT+CS) E COM AO (Nps+AO+CS), EM PH: A) 4,5, B) 6,5, C) 7,4	49
FIGURA 5.12: LIBERTAÇÃO DA DOX AO LONGO DE 72H PARA AS MNPs LIOFILIZADAS, SEM TENSIOATIVO (Nps CS_LIOF), COM CT (NpsCT+CS_LIOF) E COM AO (NpsAO+CS_LIOF), EM PH: A) 4,5, B) 6,5, C) 7,4	50
FIGURA 5.13: VIABILIDADE CELULAR EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MNPs SEM TENSIOATIVO (Nps), MNPs DE CITRATO DE SÓDIO (Nps CT) E MNPs DE ÁCIDO OLEICO (Nps AO), PARA CÉLULAS A) VERO E B) SAOS-2...55	55
FIGURA 5.14: VIABILIDADE CELULAR PARA AS MNPs COM CS, EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MNPs SEM TENSIOATIVO (Nps+CS), MNPs DE CITRATO DE SÓDIO (Nps CT+CS) E MNPs DE ÁCIDO OLEICO (Nps AO+CS), PARA CÉLULAS A) VERO E B) SAOS-2.	56
FIGURA 5.15: VIABILIDADE CELULAR ANTES E DEPOIS DOS ENSAIOS DE HIPERTERMIA PARA CÉLULAS A) VERO E B) SAOS-2	58
FIGURA 0.1: ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DA DOX LIVRE, OBTIDO DA BIBLIOGRAFIA. (ADAPTADO DE [58])	71
FIGURA 0.2: LIBERTAÇÃO DE DOX NOS TRÊS PH PARA A) MNPs COM CT E B) MNPs COM AO	72
FIGURA 0.3: LIBERTAÇÃO DE DOX NOS TRÊS PH PARA A) MNPs REVESTIDAS COM CS E B) MNPs LIOFILIZADAS	72

Lista de Tabelas

TABELA 4.1 ESQUEMA DOS ENSAIOS DE LIBERTAÇÃO DE FÁRMACO REALIZADOS.	28
TABELA 4.2 PARÂMETROS UTILIZADOS EM TODOS OS ENSAIOS REALIZADOS EM HIPERTERMIA.....	30
TABELA 5.1: ESQUEMA DAS DIFERENTES MNPs PRODUZIDOS E AS SUAS APLICAÇÕES NESTE TRABALHO.	34
TABELA 5.2: VALORES DE EE MÁXIMOS E MASSA DE DOX CORRESPONDENTE	42
TABELA 5.3: VALORES DE <i>SAR</i> E <i>ILP</i> OBTIDOS, ATRAVÉS DE ENSAIOS DE HIPERTERMIA, PARA AS MNPs PRODUZIDAS NESTE TRABALHO.	51
TABELA 5.4: RESULTADOS DA APLICAÇÃO DA HIPERTERMIA EM DIFERENTES MNPs E COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, PARA ATINGIR 43°C.....	54

Siglas e Acrónimos

AO	Ácido Oleico
Cs	Quitano
CT	Citrato de Sódio
Dox	Doxorrubicina
EE	Eficiência de encapsulamento
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
<i>ILP</i>	Perda de potência intrínseca
mNPs	Nanopartículas magnéticas
IRM	Imagem por ressonância magnética
PBS	Solução tampão de fosfato
rpm	Rotações por minuto
SAR	Taxa de absorção específica
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
TGA	Análise Termogravimétrica
TID	Efeito da dose térmica
TPP	Tripolifosfato de Sódio

1. Introdução

O cancro tem-se tornado, mundialmente, numa das doenças mais preocupantes pela sua severidade e crescente incidência. Segundo as estatísticas, no ano de 2012 foram registados, a nível mundial, 14,1 milhões de novos casos de cancro e 8,2 milhões de mortes provocadas por esta doença [1].

Em Portugal, no ano 2000 foram contabilizadas 36 835 pessoas com cancro, passando para 49 174 no ano de 2012, com uma mortalidade estimada superior a 50% dos casos. Os cancros de próstata e intestino representam os dois tipos de cancro mais comuns [2].

A cirurgia de remoção do tumor, sendo a abordagem mais importante no tratamento da doença, nem sempre é suficiente para a eliminação total da mesma. Os tratamentos complementares existentes atualmente, como a quimioterapia e radioterapia convencionais, não se têm revelado totalmente eficazes e estão associados a um elevado número de efeitos secundários indesejados [3].

Este trabalho surge, então, da necessidade de aperfeiçoamento das terapias existentes, assim como do estudo de novos métodos mais eficazes, mais direccionados e com menos efeitos colaterais. Aqui, a hipertermia revela-se uma opção bem estabelecida e várias investigações têm sido feitas de forma a aperfeiçoar a sua aplicação clínica.

A hipertermia consiste no aumento da temperatura numa dada região do organismo. Ao contrário das células normais, as células tumorais são muito sensíveis a este aumento de temperatura. Assim sendo, o objetivo desta técnica passa por provocar a morte nas células tumorais devido às oscilações de temperatura, reduzindo os efeitos colaterais [3].

Existem diferentes tipos de hipertermia, tais como a hipertermia por banho quente, de aquecimento por perfusão, de radiação de alta frequência e hipertermia magnética. Os locais de aplicação do tratamento também podem variar, podendo a hipertermia ser localizada, regional ou de corpo inteiro. [4, 5] Neste trabalho, é estudada a hipertermia magnética associada ao uso de

nanopartículas magnéticas (mNPs). Estas têm a particularidade de gerar calor, pela aplicação de um campo magnético externo alternado [6].

A nanotecnologia, devido à sua diversidade de aplicações, está a despertar grande interesse clínico, quer no diagnóstico terapêutico precoce, quer no tratamento médico de doenças, como é exemplo o cancro. A utilização destes materiais tem-se revelado um meio de diagnóstico e tratamento mais rápido, eficaz e multidisciplinar, relativamente aos meios utilizados atualmente [7, 8]. Para a sua aplicação, as mNPs devem ter características tais como elevada magnetização, um núcleo com dimensões inferiores a 100 nm e pequena distribuição de tamanho, que lhes conferem propriedades superparamagnéticas. Para uma possível aplicação *in vivo*, as suas superfícies têm, ainda, de ser revestidas por materiais biocompatíveis e não tóxicos [5].

As mNPs de óxido de ferro, para além das suas aplicações em hipertermia, têm também aplicações noutras áreas biomédicas como, por exemplo, no melhoramento do contraste na imagem por ressonância magnética (IRM), em substituição do gadolínio (agente de contraste comumente utilizado), e na libertação controlada de fármaco [9].

As suas vantagens passam por maior tempo de permanência no organismo em fase cirúrgica, melhoramento da qualidade da imagem e, conseqüentemente, melhor deteção [7]. Devido às suas características superparamagnéticas, a sua ativação só é possível na presença de um campo magnético externo [9].

Em termos energéticos, o recurso a estas partículas leva a menores perdas de energia térmica dentro do organismo, comparativamente a outros métodos, o que as torna uma mais-valia na aplicação em hipertermia [10].

Resultados de investigação em IRM, publicados em 2003 por *Harisinghani et al* mostram que, recorrendo a nanopartículas superparamagnéticas linfotrópicas de óxido de ferro, é possível detetar metástases nos nódulos linfáticos de cancro na próstata que, até ao momento, eram de impossível deteção, por outro método não invasivo [11].

Estudos feitos em 2013 por *Javid et al* nomeiam a entrega de fármacos, recorrendo à nanotecnologia, como uma técnica viável e promissora, deixando em aberto a proposta de mais investigações nesta área, com vista ao melhoramento da sua eficácia na aplicação clínica [8].

A doxorubicina é um fármaco usado atualmente nos regimes de quimioterapia de tumores, cuja aprovação foi feita há quase 20 anos [7]. Contudo, este fármaco apresenta inúmeros efeitos secundários graves, tais como lesões cardiovasculares, sendo necessário o estudo de novos sistemas de distribuição de fármaco, de forma a reduzir esses efeitos. A doxorubicina foi o fármaco utilizado no estudo dos sistemas de libertação de fármaco, levados a cabo neste trabalho.

1.1. Objetivos e estruturação do trabalho

O objetivo deste trabalho é estudar a liberação controlada de fármaco para aplicação em hipertermia magnética (recorrendo a mNPs de Fe_3O_4), assim como a influência dos tensioativos e do quitosano no revestimento das mNPs.

Assim sendo, as diferentes etapas do trabalho passam por:

1. Despolimerização do quitosano existente em laboratório para utilização ao longo do trabalho;
2. Produção das mNPs de Fe_3O_4 , por precipitação química, com dois tensioativos diferentes e o seu revestimento com quitosano;
3. Encapsulamento do fármaco nas diferentes mNPs produzidas e estudo da sua liberação em diferentes pH;
4. Avaliação da capacidade de aquecimento das mNPs produzidas e o efeito da utilização dos tensioativos em hipertermia magnética;
5. Estudo da citotoxicidade das mNPs e da aplicação da hipertermia em duas culturas celulares diferentes.

Relativamente ao documento escrito, a presente dissertação estrutura-se em 6 capítulos:

A introdução, no presente capítulo, com a contextualização do trabalho, referência a alguns conceitos utilizados, estudos realizados, objetivos e estrutura do documento;

O capítulo 2, referente à hipertermia, onde se define o conceito, os tipos de hipertermia, as suas aplicações, materiais utilizados e estudos já realizados;

O capítulo 3, das mNPs, destacando em particular as de Fe_3O_4 , os tensioativos, revestimento com quitosano, métodos de síntese e a sua associação à liberação de fármacos;

O capítulo 4, onde são descritos todos os procedimentos experimentais realizados ao longo deste trabalho;

O capítulo 5 onde são apresentados e discutidos os resultados obtidos neste trabalho;

O capítulo 6, último capítulo do trabalho, onde são tecidas algumas conclusões acerca deste trabalho, assim como perspectivas futuras.

2. Hipertermia

Ao tratamento do cancro, pela administração de calor de diferentes formas numa parte do corpo ou no corpo inteiro, dá-se o nome de hipertermia [4].

A técnica de tratamento do cancro pela aplicação de calor no local do tumor é um conceito antigo que surgiu com Hipócrates, pai da medicina, que tratava tumores superficiais com ferros quentes [5]. Além disso, num dos primeiros livros de medicina de Edwin Smith, editado há mais de 5000 anos, há registo da utilização desta técnica para cauterizar um tumor de mama [12]. Com o avanço da medicina, outros tipos de hipertermia foram surgindo, tais como a hipertermia de banho de água quente, de aquecimento por perfusão, por radiação de alta frequência e hipertermia de fluido magnético [5].

2.1. Tipos de hipertermia

De uma forma geral, a hipertermia pode ser dividida em dois tipos, catalogando-a em conformidade com o recurso, ou não, à nanotecnologia.

Quanto à hipertermia sem recurso à nanotecnologia, esta pode ser dividida em cinco tipos, de acordo com o método utilizado, sendo eles:

1. Hipertermia recorrendo a rádio frequência externa;
2. Hipertermia por perfusão;
3. Hipertermia com recurso a um campo magnético externo;
4. Hipertermia utilizando cateteres para a aplicação de calor num tecido alvo;
5. Hipertermia utilizando injeção de partículas magnéticas e a aplicação de um campo magnético externo.

Por sua vez, a hipertermia recorrendo à nanotecnologia tem por base o uso de nanopartículas magnéticas no local do tumor, que são aquecidas por campos magnéticos alternados. Podem também ser utilizadas nanoestruturas constituídas por nanopartículas [3].

2.1.1.Hipertermia magnética

A hipertermia magnética consiste na aplicação de um campo magnético alternado numa determinada zona corporal, que leva a um aumento da temperatura da mesma.

A hipertermia magnética utiliza mNPs revestidas por materiais biocompatíveis. Estas nanopartículas, através da sua circulação na corrente sanguínea podem ser direcionadas ao local do tumor, pela aplicação de um campo magnético externo. Já no local do tumor, é aplicado um campo magnético alternado que, pela agitação das mNPs, leva assim a um aumento da temperatura na zona do tumor [6].

Em termos clínicos, esta é aplicada maioritariamente como complemento a tratamentos oncológicos, como por exemplo a radioterapia ou quimioterapia. Atualmente, está a ser estudada a eficácia da sua aplicação de forma isolada. Inúmeros estudos feitos até ao momento, nomeadamente em doentes com neoplasias em estado avançado de desenvolvimento, mostram que estas técnicas convencionais, quando aliadas à hipertermia, produzem melhores resultados do que aplicadas isoladamente [4, 5, 13, 14].

Entre as vantagens do aquecimento pela via magnética destacam-se o facto de o campo magnético não ser absorvido pelos tecidos vivos. Assim, é possível afetar tumores mais profundos e limitar, com maior precisão, a área desejada, pela condução ou introdução dos materiais magnéticos no local a atingir. A escolha dos materiais é de extrema importância, visto que estes podem desencadear reações de rejeição por parte do organismo. Atualmente, um dos materiais mais utilizados são as partículas finas de óxido de ferro [5, 15].

O objetivo a curto prazo do recurso à hipertermia para tratamentos oncológicos é provocar a morte das células tumorais, pela aplicação de calor no local do tumor, sem necessidade de recorrer à quimioterapia ou radioterapia. A investigação atual, feita neste sentido, assenta no facto de as células tumorais, ao contrário das normais, serem muito sensíveis a aumentos de temperatura. As células tumorais, devido à sua baixa oxigenação encontram-se em estado de hipóxia. Esta condição torna-as mais sensíveis ao aumento de temperatura do que as células bem oxigenadas. Assim, será possível tratar os tumores com calor, diminuindo os efeitos indesejados nas células circundantes [5, 13]. Novas aplicações desta técnica são, atualmente, alvo de estudo como é exemplo a libertação controlada de fármacos em hipertermia, transportados pelas nanopartículas magnéticas [16, 17].

A eficácia da hipertermia está dependente de vários fatores como o local da aplicação do tratamento, o tipo de células tumorais, a temperatura e tempo de exposição [16].

2.2. Classificação da hipertermia

A hipertermia pode ser classificada em três tipos, segundo o seu local de aplicação, sendo eles:

1. Hipertermia local - aplicada apenas num local específico do corpo;
2. Hipertermia regional - aplicada não apenas num local mas sim numa região mais abrangente;
3. Hipertermia de corpo inteiro – aplicada em todo o corpo e utilizada no tratamento de metástases.

Esta última é considerada mais invasiva, está associada a um grau de toxicidade considerável e é a menos utilizada e estudada atualmente. Contudo, testes clínicos feitos na Alemanha indicam-na como uma técnica promissora no tratamento de tumores com metástases [4, 16]. A aplicação de quimioterapia aliada à hipertermia de corpo inteiro foi testada e comprovada clinicamente por Larkin que observou uma diminuição dos tumores recorrendo à junção destas técnicas [18].

Estes resultados foram comprovados por *Engelhardt et al* que obtiveram resultados positivos em tratamentos do cancro do pulmão com pequenas metástases por todo o corpo, recorrendo novamente à hipertermia aliada à quimioterapia [17].

Relativamente à quantidade de calor gerado, a hipertermia pode ser classificada em três tipos:

1. Diatermia (temperaturas inferiores a 41 °C) – Normalmente utilizada em doenças do foro reumatológico;
2. Moderada (Temperaturas entre 42 e 46 °C) - Tipo de hipertermia mais utilizado, nomeadamente como complemento em tratamentos tumorais;
3. Termoablação (Temperaturas superiores a 46 °C) – Provoca morte celular e necrose do tecido, coagulação ou carbonização [16].

2.3. Parâmetros da hipertermia

Com a aplicação da hipertermia nos tecidos vivos, as células normais, embora possam sofrer danos, sobrevivem ao aumento de temperatura mas as células tumorais não, dando-se assim a sua morte a temperaturas entre os 42 e 45 °C [13].

Estudos feitos *in vitro* e em animais, com temperaturas entre os 41 e 47 °C, mostram uma relação direta entre o aumento da temperatura aplicada e a morte celular [4]. No entanto, a tolerância a altas temperaturas não é a mesma nas diferentes partes do corpo. Estudos feitos em 2002 por

Hurwitz et al para avaliar a toxicidade provocada pelo aumento da temperatura na parede rectal (para tratamento do cancro da próstata) só garantem a não existência de danos para temperaturas até 42 °C [19]. Deste modo, é necessário compensar uma temperatura mais baixa com outro fator, de forma a não comprometer a eficácia do tratamento. Para tal, pode-se utilizar o conceito de efeito da dose térmica (TID).

2.3.1. Efeito da dose térmica, (Thermal Iseffect dose, TID)

O TID é usado na aplicação clínica da hipertermia, com a finalidade de comparar a relação dos efeitos entre tempo e temperatura de exposição diferentes. Este conceito surgiu na tentativa de reduzir a temperatura de exposição e foi observado que, para temperaturas superiores a 42,5 °C, uma diminuição de 1 °C pode ser compensada duplicando o tempo de exposição. Já para temperaturas menores que 42,5 °C, a eficiência do tratamento mantém-se praticamente inalterada, mesmo com o aumento do tempo de exposição, como se pode observar na Figura 2.1 [4].

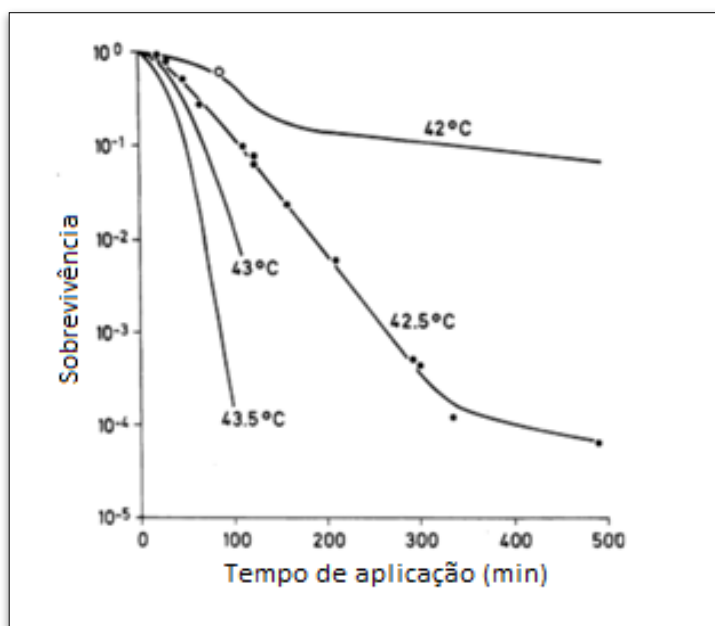


Figura 2.1: Relação entre a sobrevivência celular, temperatura de hipertermia e tempo de exposição.
(Adaptado de [4])

2.3.2. Taxa de absorção específica (SAR)

O SAR é definido como a capacidade que um dado material magnético tem para gerar calor. Assim, este parâmetro é utilizado para caracterizar a eficiência de aquecimento de um material magnético, através da sua absorção de energia durante a exposição a um campo magnético

alternado. O seu valor é então definido como a quantidade de energia absorvida pela amostra, por unidade de massa (W/g) e a sua expressão é dada por (equação 1):

$$SAR = \frac{dT}{dt} \frac{C V_s}{m_{Fe}} \quad (\text{Equação 1})$$

Em que dT/dt é dado pelo aumento de temperatura num intervalo de tempo, C é o calor específico da amostra, V_s o volume da amostra e m_{Fe} a massa do material magnético, em gramas [20, 21].

Embora este parâmetro seja o utilizado neste trabalho para o tratamento dos resultados, na literatura é possível encontrar dois termos equivalentes, sendo eles a perda de potência específica (SPL) e a absorção de energia específica (SPA).

2.3.3. Perda de potência intrínseca (ILP)

O parâmetro referido acima, SAR , nem sempre permite a comparação de valores entre experiências realizadas em diferentes equipamentos, uma vez que é um valor intrínseco ao equipamento utilizado porque depende da intensidade e frequência do campo magnético aplicado. De forma a utilizar um valor independente destes parâmetros, é introduzido o conceito de perda de potência intrínseca (ILP). Este valor é calculado pela seguinte expressão (equação 2):

$$ILP = \frac{SAR}{H^2 \cdot f} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde H e f são, respetivamente, a intensidade e frequência do campo magnético aplicado [20].

2.4. Efeitos celulares da hipertermia

As células tumorais têm um fluxo sanguíneo menor e mais heterogéneo do que as células normais, com consequente diminuição no aporte de oxigénio [4]. O meio extracelular que envolve estas células apresenta um pH inferior ao normal (ácido). Assim sendo, dado este meio extracelular ácido, as células tumorais necessitam de ativar mecanismos de defesa para manter o seu pH normal [22]. A proliferação tumoral dá-se por vascularização do tecido hospedeiro. À medida que o tumor cresce, a sua vascularização torna-se mais irregular, o que pode levar a um crescimento celular descontrolado [17]. Estudos iniciados na década de 70 e 80 mostraram que a hipertermia também provoca alterações no fluxo de sangue, oxigénio e nutrientes nas células tumorais, assim como microtromboses e acidez tumoral. Uma única aplicação do tratamento pode provocar danos celulares permanentes desencadeados por vários mecanismos intra e extra celulares de degradação como a desnaturação de proteínas, alterações de pH e mutações no ADN. Todos estes fenómenos podem levar à morte celular, quer por necrose, quer por apoptose [4, 16].

A célula não reage à hipertermia sempre da mesma forma ao longo das diferentes fases do ciclo celular. Apesar da fase S ser sensível ao calor, a fase mitótica é aquela que apresenta uma maior sensibilidade ao aumento da temperatura, verificando-se nestas duas fases uma morte celular lenta após aplicação de calor. Já na fase G1, há dois tipos de reações possíveis e opostas. Por um lado, pode haver grande resistência ao calor e, por outro, pode haver uma morte rápida da célula, logo após a aplicação do tratamento [4].

Estudos feitos mostram que, após o tratamento com hipertermia, o organismo pode desenvolver anticorpos para as células tumorais. Em 2005, *Sincai et al* publicaram os resultados da sua investigação em tumores mamários de gatos. Aqui, após 2 meses de aplicação de hipertermia com mNPs, com uma concentração de $3,72 \text{ mg/cm}^3$ de tumor e 116 mg/Kg de corpo, um campo magnético de 0,1 Tesla e um tempo de aplicação variável entre 20 a 30 min, foi observada, para além de elevada redução tumoral, a presença de anticorpos no organismo, não existentes antes da aplicação do tratamento. Exames citológicos evidenciaram lise celular e necrose causadas por esta concentração de mNPs [23].

Em 2010, *Sivasai et al* apresentam um estudo que vem corroborar a hipótese de *Sincai et al*. Numa experiência para tratar tumores em ratinhos, utilizando nanopartículas magnéticas de Fe e Fe_3O_4 , foi mostrado que estes desenvolveram anticorpos para as células tumorais, apenas com três aplicações de hipertermia de 10 min cada [24].

2.5. Nanopartículas magnéticas em hipertermia

Um dos grandes estímulos para a investigação em hipertermia é a possibilidade de conduzir o calor no interior do organismo até aos órgãos alvo, preservando as células saudáveis. Este calor pode ser obtido pela irradiação de ondas eletromagnéticas ou pela injeção de materiais externos, que transfiram energia para o local. Atualmente são utilizadas diversas fontes como a radiofrequência, ultrassons, micro-ondas ou partículas magnéticas excitáveis [16].

O uso de materiais magnéticos em hipertermia foi proposto pela primeira vez em 1957 e, hoje em dia, são conhecidas inúmeras vantagens em recorrer à utilização de partículas magnéticas, mais concretamente nanopartículas magnéticas (mNPs), comparativamente ao tratamento convencional [16].

As dimensões destas mNPs, comparativamente às de uma célula, são cerca de 100 a 1000 vezes menores. Devido às suas características magnéticas, é possível manipular a sua condução pela aplicação de um campo magnético externo e, assim, aumentar a temperatura apenas nas células alvo. As mNPs para aplicação em hipertermia deverão ter dimensões entre 100 e 200 nm, que lhes permitam acumular-se preferencialmente nas células tumorais [5, 25]. Estas dimensões reduzidas permitem uma melhor circulação até às células tumorais e interação com

o seu ADN, proteínas, enzimas e recetores celulares. A sua geração de calor é homogénea e eficaz. Além disso, devido à vascularização irregular das células tumorais, há uma maior concentração das mNPs nessas células, em comparação com as células normais, reduzindo os danos nas últimas.

Outra vantagem do uso destas nanopartículas é o facto de poderem transportar fármacos até à zona tumoral. O aquecimento no interior das matrizes poliméricas das nanopartículas pode levar à criação de espaços vazios, sendo assim possível a libertação controlada dos fármacos aí contidos. Esta característica confere também uma abordagem multi terapêutica na utilização das mNPs, alongando a investigação para a aplicação noutros campos da terapia clínica [8, 16, 26].

Em 2005, *Lu et al* publicaram o primeiro estudo acerca da possibilidade da utilização de mNPs na libertação controlada de fármacos. Aqui foram utilizadas nanopartículas ferromagnéticas de cobalto, revestidas por ouro, e aplicados campos magnéticos alternados com frequências entre 100 a 300 Hz [27].

As mNPs mais utilizadas para aplicação em hipertermia são as de óxido de ferro, sendo elas a magnetite (Fe_3O_4) ou a magmíte ($\gamma - \text{Fe}_3\text{O}_4$) [28].

3. Nanopartículas magnéticas

As nanopartículas são partículas cujas dimensões se encontram à nanoescala. As nanopartículas magnéticas (mNPs) são então nanopartículas que contêm materiais magnéticos na sua constituição como, por exemplo, o ferro, níquel, cobalto e os seus óxidos. As suas propriedades magnéticas resultam da combinação da sua composição, estrutura e tamanho [29].

As mNPs são geralmente constituídas por um núcleo inorgânico cuja dimensão deverá ser inferior a 100 nm, revestido por uma superfície biocompatível que lhe deverá conferir estabilidade em meio fisiológico. Devem possuir, também, grande capacidade de se acumularem nas células tumorais e elevada eficiência térmica para a acumulação de calor. Devido às suas propriedades magnéticas, têm a capacidade de gerar calor quando manipuladas por um campo magnético externo, levando a que sejam cada vez mais utilizadas em aplicações biomédicas, nomeadamente em hipertermia magnética [5, 16, 26].

Características como estabilidade, elevada biocompatibilidade e degradação distinguem as mNPs de óxido de ferro, relativamente às restantes [29].

3.1. Nanopartículas magnéticas (mNPs) de óxido de ferro

As mNPs de óxido de ferro são as mais utilizadas em diversas aplicações biomédicas devido às suas características supracitadas. Entre as suas aplicações, destacam-se a imagem por ressonância magnética (para melhoramento do contraste), a hipertermia, pela aplicação de um campo magnético alternado e o transporte de fármacos, para tratamento de diferentes tipos de cancro [8, 9].

Apesar do uso de partículas de óxido de ferro de pequenas dimensões, para aplicações *in vivo*, existir há cerca de 40 anos, na última década tem-se verificado um estudo mais acentuado das mesmas, com principal destaque na magnetite, Fe_3O_4 , pela sua elevada biocompatibilidade e magnetização, baixa toxicidade e elevada temperatura de Curie [5, 16].

Relativamente à sua aplicação em hipertermia, quando estas nanopartículas se encontram dentro do organismo, têm a capacidade de atingir a zona tumoral, pela aplicação do campo magnético externo dirigido ao local do tumor. Já no local, estas são ativadas apenas na presença de um campo magnético alternado e não mantêm a magnetização quando esse campo é removido. Devido às suas características superparamagnéticas (comportam-se como um único dipolo magnético) possuem um elevado momento magnético [30].

A capacidade das mNPs na produção de calor está dependente da dissipação de calor das partículas e, consequentemente, do seu tamanho. Estudos feitos em diferentes tamanhos, no intervalo de 15 a 50 nm, mostram que a eficácia de aquecimento aumenta para tamanhos mais pequenos das partículas [16]. *Hergt et al* estudaram a otimização dos parâmetros do campo magnético e das propriedades das mNPs para aplicação no tratamento do cancro. Nos seus resultados, publicados em 2006, foram reveladas algumas características ótimas. Entre elas destacam-se as dimensões médias de 18 nm para estas partículas, com uma estreita distribuição de tamanho, concentrações no organismo de 10 mg/cm^3 de tumor e campo magnético aplicado com frequências na ordem dos 500 KHz. Foi revelado, também, que o tumor não deve ter um diâmetro inferior a 1 cm [31].

De entre as mNPs de óxido de ferro, destacam-se a magmíte, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ e a magnetite, Fe_3O_4 (utilizada neste trabalho) [32]. A magnetite é o óxido de ferro que apresenta características mais interessantes. Possui catiões de ferro em dois estados de valência, bivalente (Fe^{2+}) e trivalente (Fe^{3+}), em estrutura espinhela inversa (Figura 3.1). A sua estrutura cristalina revela uma sequência de camadas de Fe e O, onde o Fe^{2+} ocupa apenas os espaços octaédricos e o Fe^{3+} os espaços tetraédricos e octaédricos.

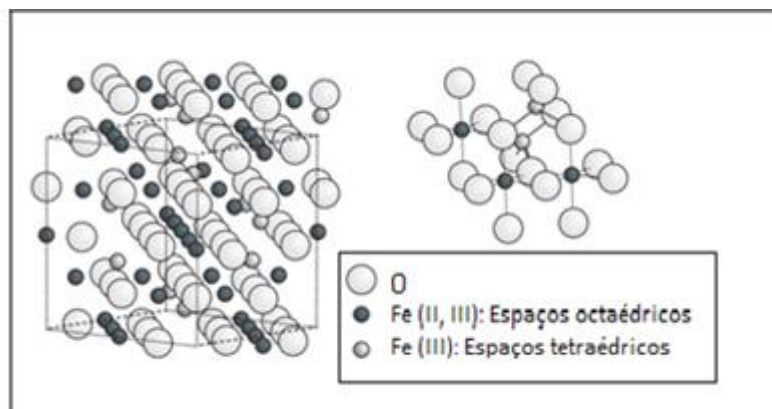


Figura 3.1: Estrutura cristalina da magnetite. (Adaptado de [33])

Na presença de núcleos esféricos individuais de dimensões reduzidas (inferiores a 30 nm), a magnetite comporta-se como uma partícula superparamagnética ao invés de uma partícula ferromagnética, devido ao elevado momento magnético que possui. Assim, torna-se facilmente magnetizável, pela aplicação de um campo magnético externo. Na ausência de campo magnético as nanopartículas superparamagnéticas não apresentam magnetização remanescente. Aqui, a sua capacidade de gerar calor deve-se ao relaxamento do momento magnético e a sua perda por histerese é muito baixa, quase inexistente [3, 29].

Como já referido, as mNPs têm a capacidade de se ligarem a diferentes compostos, como fármacos, proteínas ou enzimas. Para tal, as características das mesmas são de extrema importância, visto que devem ser uniformes (na forma e tamanho), biocompatíveis, não-tóxicas e atingirem um determinado alvo dentro do organismo. Estas características são conferidas pelo revestimento das nanopartículas que deve ser escolhido tendo em atenção a aplicação das mesmas [5].

3.2. Revestimento das mNPs

Uma das propriedades das mNPs é a tendência natural que estas têm para formar aglomerados em soluções aquosas. Quando tal acontece, podem perder total ou parcialmente o seu magnetismo. Para tal ser evitado, é necessário que estas sejam revestidas para que a sua superfície fique adequadamente modificada, evitando a aglomeração [9].

O revestimento das mNPs pode ser de origem sintética, natural (por exemplo proteínas) e de moléculas anfifílicas, como os ácidos gordos [26].

Como as propriedades magnéticas das nanopartículas são conferidas pela superfície, esta tem tido algum destaque nos estudos feitos relativamente a estes materiais. As suas características podem diferir, não só no tipo material, como também no tamanho, forma e arranjo. Este último

pode assumir uma estrutura de camada sobre camada, contendo um núcleo e a junção de diferentes materiais, em várias camadas, conferindo, assim, a uma mesma partícula diferentes propriedades com interesse [16].

Dentro dos materiais utilizados no revestimento das mNPs encontram-se alguns tensioativos, como o ácido oleico, citrato de sódio e ácido cítrico. Este último pode trazer alguns inconvenientes como a precipitação, na presença de certos materiais (o ácido cítrico precipita na presença de Cálcio ou Magnésio), ou o aumento do grau de toxicidade. Os polímeros sintéticos, biocompatíveis e solúveis em água, como é exemplo o quitosano e o dextrano são também frequentemente utilizados no revestimento das mNPs [9].

Quer os tensioativos utilizados como revestimento, quer os polímeros devem ter características anfífilas, evitar a aglomeração das nanopartículas e a sua precipitação em meio biológico, assim como aumentar a biocompatibilidade [34].

Neste trabalho, os materiais utilizados como tensioativos das nanopartículas são o ácido oleico e o citrato de sódio. O quitosano será também utilizado como revestimento.

3.2.1. Ácido Oleico

O ácido oleico (Figura 3.2) destaca-se dos restantes tensioativos pela sua melhor afinidade com a superfície da magnetite. É classificado como ácido gordo insaturado de cadeia longa e possui 18 carbonos. É um ácido carboxílico devido à presença do grupo funcional COOH. Sendo uma molécula anfífila, possui uma extremidade hidrofóbica e uma hidrofílica, permitindo a ligação à superfície da nanopartícula e a sua dispersão em solução aquosa. Quando usado em quantidades superiores a 20% da massa das nanopartículas em solução pode formar uma bicamada. É incolor e inodoro [35].

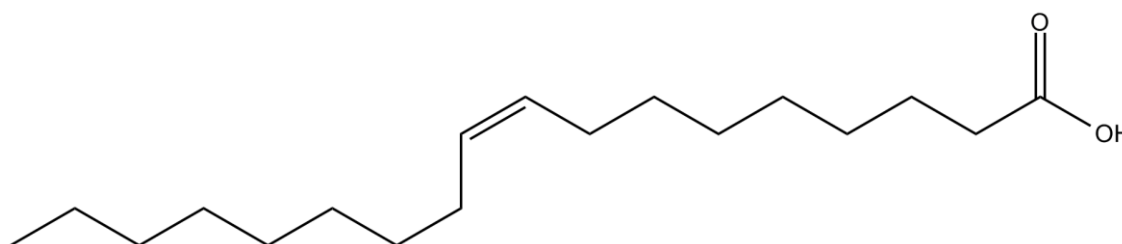


Figura 3.2: Estrutura química da molécula de ácido oleico.

3.2.2. Citrato de sódio

O citrato de sódio (Figura 3.3) é um sal derivado do ácido cítrico, muito utilizado na síntese de nanopartículas de prata e de ouro. Quando ligado às nanopartículas cria uma carga de superfície

negativa. É comumente usado como tensoativo devido à sua solubilidade em diferentes solventes [35, 36].

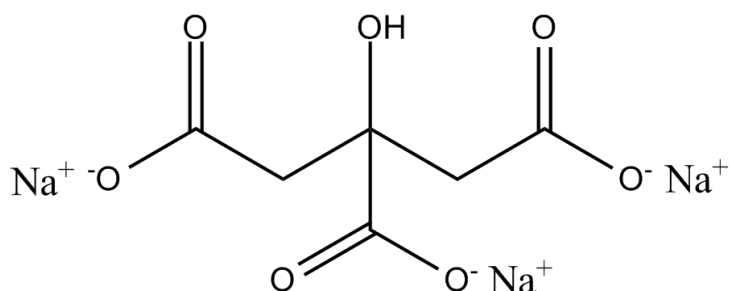


Figura 3.3: Estrutura química do Citrato de Sódio.

3.2.3. Quitosano

O quitosano (Cs) é um polímero natural derivado da quitina, o segundo biopolímero mais abundante na natureza, a seguir à celulose. A principal fonte de quitina é o exosqueleto dos crustáceos. A quitina e o quitosano são co-polímeros lineares de unidades glucosamina e acetilglucosamina. A diferença entre a quitina e o quitosano é feita através do grau de desacetilação (fração molar de unidades glucosamina; DD na figura 3.4): superior a 0,5 (tipicamente entre 0,6 e 0,9) no quitosano e inferior a 0,5 na quitina [38]. O quitosano apresenta carga positiva em solução, o que lhe confere maior atração para as membranas celulares, que são carregadas negativamente (Figura 3.4) [39]. O Cs tem, também, a particularidade de aumentar a permeabilidade da membrana celular. Revela uma grande biocompatibilidade, resistência mecânica e baixa toxicidade, o que lhe confere grande interesse em aplicações biomédicas e farmacêuticas, como revestimento de nanopartículas e entrega de fármacos [8, 39].

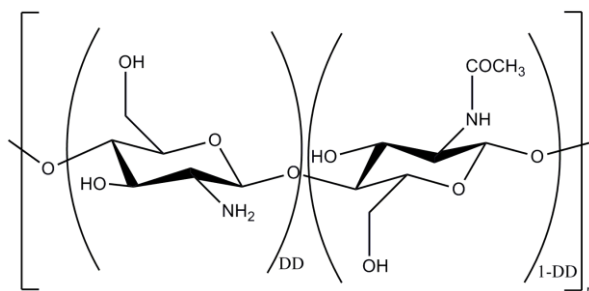


Figura 3.4: Estrutura química do quitosano.

3.3. Nanopartículas magnéticas como sistema de libertação de fármacos

Existem alguns problemas associados à libertação de fármacos em nanopartículas, que, quando presentes, levam a uma ineficácia do tratamento. São exemplo a incapacidade de controlar a

libertação e a instabilidade que o fármaco pode provocar às nanopartículas [41]. Parte destes problemas podem ser resolvidos recorrendo ao transporte de fármacos pela utilização de mNPs contendo um núcleo magnético e um revestimento polimérico. Aqui, é necessário estudar a quantidade de fármaco a transportar e é possível controlar a sua libertação através da aplicação controlada de um campo magnético alternado [42].

Há três tipos possíveis de associação entre o fármaco e as mNPs para utilização em hipertermia, todos com agentes de orientação das nanopartículas, na superfície (Figura 3.5):

1. O fármaco está encapsulado dentro da matriz polimérica e esta forma uma espécie de escudo que contém o núcleo magnético ao centro e o fármaco;
2. A nanopartícula, o fármaco e o polímero formam um só;
3. O núcleo contém o fármaco. O polímero, por sua vez, forma um anel exterior encapsulando as nanopartículas [16].

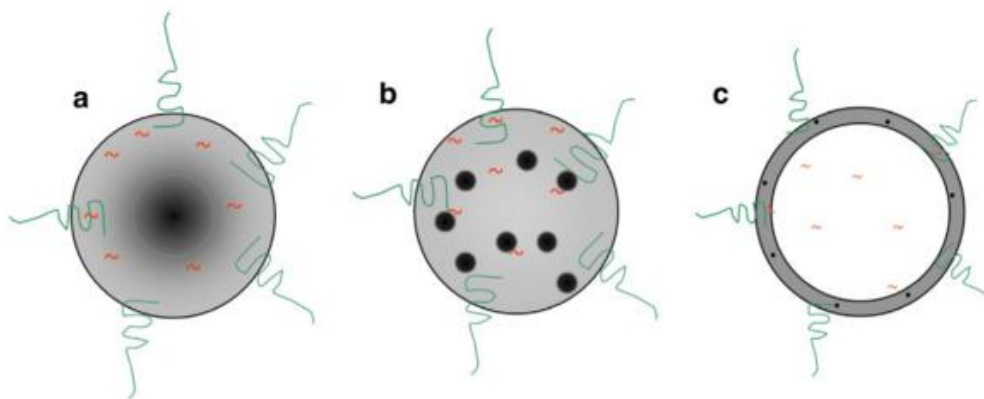


Figura 3.5: Esquema representativo dos três diferentes tipos de nano-estruturas em hipertermia para libertação de fármacos (Retirado de [16]).

Quanto à libertação do fármaco de forma controlada em hipertermia, existem dois mecanismos, recorrendo à utilização de mNPs, sendo eles a libertação por rutura e por aumento de permeabilidade (Figura 3.6).

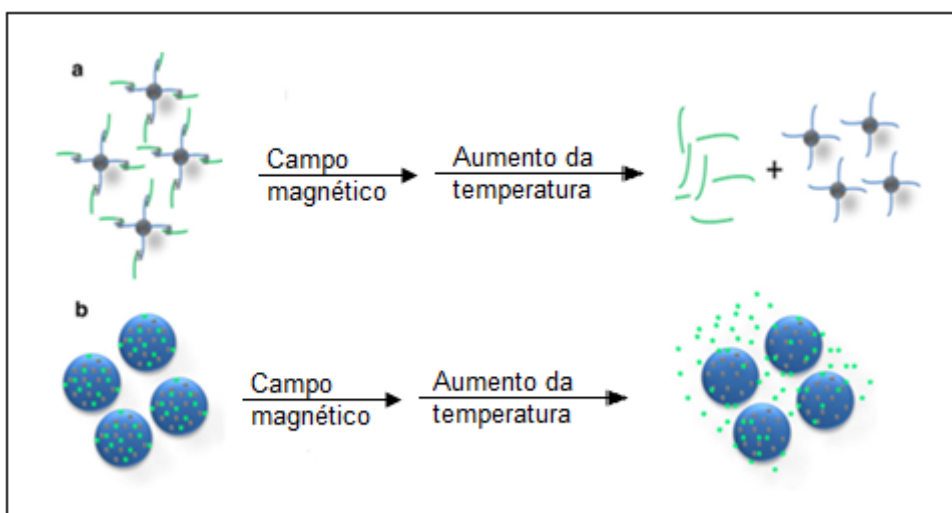


Figura 3.6: Esquema representativo dos dois tipos de liberação controlada de fármacos em hipertermia usando mNPs. a) Liberação por ruptura. b) Liberação por permeabilidade. (Adaptado de [16])

No primeiro, o fármaco está ligado às nanopartículas através de uma proteína ligante. Aqui, a liberação dá-se quando há o aquecimento e consequente rutura desse mesmo ligante. No segundo, a liberação ocorre dentro de uma matriz polimérica. O aumento da temperatura provoca a abertura de fendas no polímero, termicamente sensível, que leva à liberação do fármaco encapsulado. Quando pequenas, estas fendas podem ser reversíveis e há um curto período de aplicação de calor. Para períodos longos há uma evolução na intensidade das fendas, tornando-as assim irreversíveis [16].

Num artigo publicado em 2013, *Javid et al* mostram que o transporte e liberação de fármacos de forma controlada, recorrendo a mNPs, podem induzir a apoptose das células tumorais e diminuir os efeitos secundários negativos de alguns agentes cancerígenos. No entanto, para uma aplicação clínica, são necessários mais estudos e avanços laboratoriais nesta área para tornar esta técnica mais eficiente [8].

3.4. Métodos de síntese de mNPs

Os métodos existentes para a produção de mNPs podem ser divididos em dois tipos, sendo eles os métodos físicos e os métodos químicos. Os primeiros incluem a deposição por fase gasosa e a litografia por feixe de eletrões. Estes procedimentos, para além de complexos, não permitem o controlo da dimensão das partículas produzidas à nanoescala. Por sua vez, os métodos quí-

micos como a decomposição térmica, microemulsão, síntese hidrotérmica e precipitação química, para além de mais simples, permitem a produção de nanopartículas com dimensões e formas mais uniformes [5].

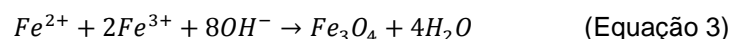
Pelas suas características a seguir enunciadas, o método utilizado para a produção de mNPs foi o método da precipitação química.

3.4.1. Precipitação química

O método de precipitação química para obtenção de mNPs foi descrito pela primeira vez em 1981 por *Massart* [43] que descreveu a co-precipitação dos sais Fe^{2+} e Fe^{3+} , em solução alcalina. Desde essa data, o método tem sido estudado e otimizado, devido às suas vantagens de produção.

Este método de produção de mNPs é relativamente simples, rápido e pouco dispendioso, comparativamente aos restantes. Consiste na co-precipitação dos sais de Fe^{2+} e Fe^{3+} com uma solução alcalina e pode ser realizado à temperatura ambiente. O controlo do tamanho dos mNPs depende de parâmetros como a razão entre o Fe^{2+} e o Fe^{3+} , o pH da solução, a força iónica do meio e o agente precipitante. Quando a concentração de sais de Fe na solução é mais baixa, as mNPs produzidas têm tamanhos mais uniformes, no entanto o número de partículas obtidas é limitado. Ao aumentar a concentração de sais, é possível obter um maior número de partículas mas ao mesmo tempo com maiores dimensões e menos uniformidade de tamanho [44].

A reação global do processo pode ser descrita pela seguinte fórmula:



4. Procedimento experimental

Neste capítulo serão expostos, de forma sintética, os procedimentos utilizados em laboratório, referindo as técnicas e os materiais utilizados em cada um deles.

4.1. Despolimerização do Quitosano

O quitosano disponível em laboratório tem peso molecular de 480 KDa. Como o peso molecular pretendido era de aproximadamente 30 KDa, de forma a se obter nanopartículas de tamanho mais reduzido, foi necessária a despolimerização do quitosano disponível. Este processo contém três fases diferentes (dissolução do quitosano em ácido acético, fragmentação e precipitação) que serão explicadas de seguida.

O quitosano obtido foi o único utilizado ao longo de todo o trabalho. Assim sendo, sempre que houver referência ao uso do quitosano, este será o obtido nesta despolimerização.

4.1.1. Materiais

Quitosano de baixo peso molecular, 480 KDa (*Cognis*), ácido acético (*Panreac*), nitrito de sódio (*Sigma-Aldrich*), hidróxido de Sódio (*Panreac*), acetato de Sódio (*Scharlau*), acetato de etilo (*Sigma-Aldrich*), água destilada.

4.1.2.Procedimento

4.1.2.1. Dissolução do quitosano

Começou-se por diluir o ácido acético glacial em água (1% V/V). De seguida dissolveu-se 5 g de quitosano na solução anterior de ácido acético (1% m/V) e deixou-se a solução em agitação magnética a uma velocidade de 60 rotações por minuto (RPM) durante 12 horas.

4.1.2.2. Fragmentação do quitosano

Em 10 ml de água destilada dissolveu-se 200 mg de Nitrito de sódio. A solução obtida foi adicionada à solução de quitosano previamente preparada e deixou-se a solução em agitação mecânica a uma velocidade de 300 RPM durante 1 hora.

4.1.2.3. Precipitação do quitosano

Preparou-se uma solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH) a 4 Molar (M). Por meio de uma pipeta de *Pasteur*, adicionou-se a solução anterior, gota a gota, à solução de quitosano, medindo simultaneamente o pH, até ocorrer a precipitação do quitosano (pH = 9). De seguida centrifugou-se a solução (*Heraeus Multifuge X1R, Thermo Scientific*) a uma velocidade de 10000 RPM durante 10 minutos e a 20°C, promovendo a formação de *pellet*. A este *pellet* acrescentou-se água e centrifugou-se novamente, nas mesmas condições. O *pellet* aqui obtido foi congelado com azoto líquido. Por fim, as amostras foram liofilizadas (*VaCo 2, ZIRBUS technology*) a -43 °C e pressão de 0,07mbar, durante 24h.

4.2. Determinação do peso molecular do quitosano por viscosimetria capilar

Após a despolimerização do quitosano, foi necessário determinar o seu peso molecular, de forma a confirmar que este era o pretendido. Para tal, utilizou-se a técnica da viscosimetria capilar. Esta técnica permite determinar o tempo de passagem de uma solução no interior de um capilar, e, recorrendo à equação de *Mark-Houwink-Sakurada* [45], calcula-se o peso molecular do soluto (neste caso, o quitosano).

4.2.1.Materiais

Ácido acético (*Panreac*), acetato de sódio (*Scharlau*), quitosano despolimerizado (obtido anteriormente) e água destilada.

4.2.2.Procedimento

Começou por se preparar uma solução aquosa de ácido acético, HAc, 0,2M e acetato de sódio, NaAc, 0,1M agitando-a por breves minutos no agitador magnético, procedendo à medição do pH. Utilizando o quitosano (como soluto) e a solução supramencionada (como solvente), fizeram-se cinco soluções de quitosano, com diferentes concentrações, sendo elas 4, 8, 12, 16 e 20 mg/ml. Após verificar que a temperatura do viscosímetro se encontrava nos 30 °C, inseriu-se no capilar do mesmo 15 ml da solução, utilizada como solvente do quitosano, e fizeram-se cinco medições do tempo de queda da mesma. Repetiu-se o passo anterior para cada uma das cinco soluções de quitosano e para o respetivo solvente.

4.3. Síntese de mNPs de Óxido de Ferro por Precipitação Química

Neste trabalho foram sintetizadas mNPs de óxido de ferro, Fe_3O_4 , pelo método da precipitação química. Foram produzidos três tipos diferentes de mNPs, sendo eles as mNPs sem tensioativo e com dois tensioativos diferentes, o Citrato de Sódio e o Ácido Oleico. Todo o procedimento foi feito na *hotte* do laboratório.

As mNPs utilizadas ao longo de todo o trabalho foram produzidas sempre por este método, com e sem os tensioativos supracitados.

4.3.1.Materiais

Cloreto de ferro hexahidratado (*Sigma-Aldrich*), cloreto de ferro tetrahidratado (*Sigma-Aldrich*), solução aquosa de amónia 25% (*Panreac*), água ultra pura (no equipamento *Elix*), ácido oleico (*Fisher Chemical*) e citrato de sódio (*Sigma-Aldrich*).

4.3.2.Procedimento

Num balão de três tubuladuras, em atmosfera de azoto, colocou-se 100 ml de água ultra pura com o cloreto de ferro hexahidratado, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (5mmol; 1M) e o cloreto de ferro tetrahidratado, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (2,5mmol; 1M). De seguida adicionou-se 10 ml de solução aquosa de amónia a 25%, iniciando aqui a agitação mecânica a 1000 RPM, durante 5 minutos. No fim da agitação colocou-se a solução sobre uma superfície magnética e adicionou-se água ultra pura. Esperou-se a deposição das mNPs e retirou-se a água da superfície. De seguida adicionou-se água ultra pura novamente e repetiu-se o processo três vezes

Para as mNPs sem tensioativo o processo de síntese termina aqui. Para as mNPs com tensioativo (ácido oleico ou citrato de sódio), adicionou-se o tensioativo nas respectivas concentrações, o ácido oleico a 64 mM e o citrato de sódio a 10mM. Por fim colocou-se em agitação mecânica a 400 RPM durante 1 hora.

4.4. Determinação da concentração das mNPs

Finalizada a síntese das mNPs, surge a necessidade de determinar a sua concentração em solução. Para tal, recorreu-se ao método da fenantrolina [46] para a preparação das amostras.

4.4.1. Materiais

Ácido clorídrico (*Panreac*) ácido clorídrico 37% V/V (*Hydrochloric Acid*), hidroxilamina (*Alfa Aesae*), fenantrolina (*Applichem*), acetato de amónia (*Sigma-Aldrich*).

4.4.2. Procedimento

Na *hotte*, diluiu-se o ácido clorídrico, HCl em água (0,01N). Usando-o de seguida, fez-se uma solução de hidroxilamina, 100 mg/ml e fenantrolina, 3 mg/ml. Fez-se ainda uma solução aquosa de acetato de amónia, 500mM.

Para cada solução de mNPs fez-se quatro réplicas, para medir a absorvância, da seguinte forma:

Na *hotte*, pipetou-se, para um *eppendorf*, 40 µl da solução de nanopartículas e 20 µl de HCl 37% e esperou-se 1 hora. Juntou-se, ao *eppendorf* anterior, 100 µl da solução de hidroxilamina e 500 µl da solução de fenantrolina. Por fim, juntou-se 1140 µl da solução de acetato de amónia, de forma a perfazer um volume total de 1800 µl (volume mínimo para usar no espectrofotómetro). De seguida mediu-se a absorvância das amostras a 510 nm, no espectrofotómetro UV-VIS.

Para determinar a concentração das amostras utilizou-se uma reta de calibração com a seguinte equação:

$$Abs = 4,5079[Fe] + 0,0753 \quad (\text{Equação 4})$$

Onde Abs representa a absorvância da amostra a 510 nm e [Fe] a concentração de ferro da amostra em mg/ml.

Por fim, medida a concentração de ferro das amostras, pelo método da fenantrolina, liofilizaram-se as suspensões para determinar a concentração das mNPs. Assim, a concentração de mNPs, [Nps], em mg/ml, obtida experimentalmente, é dada pela seguinte equação:

$$[Fe] = 0,7[Nps] \quad (\text{Equação 5})$$

4.5. Revestimento das mNPs com quitosano (Cs)

O quitosano (Cs) foi utilizado, neste trabalho, como revestimento das mNPs. O procedimento descrito abaixo promove este encapsulamento (Figura 4.1). Este procedimento foi realizado para as mNPs de óxido de ferro com e sem tensioativos.

4.5.1. Materiais

mNPs de óxido de ferro (produzidas anteriormente), Cs, tripolifosfato (TPP), (*SIGMA-Aldrich*) e água destilada.

4.5.2. Procedimento

Fez-se uma solução aquosa de mNPs, [mNPs] = 0,4 mg/ml. Utilizando uma solução aquosa de ácido acético (1% V/V), dissolveu-se o Cs (2% m/V). De seguida, diluiu-se o TPP a 0,25%. Juntou-se 1 ml da solução de mNPs com 1 ml da solução de Cs. Juntou-se 1ml de TPP e em simultâneo ligou-se o *Turrax (IKA T10 basic)* na velocidade 2, durante 5 minutos. Por fim liofilizaram-se as amostras durante 24 horas a uma temperatura de -43 °C e pressão de 0,07mbar, para posterior caracterização.

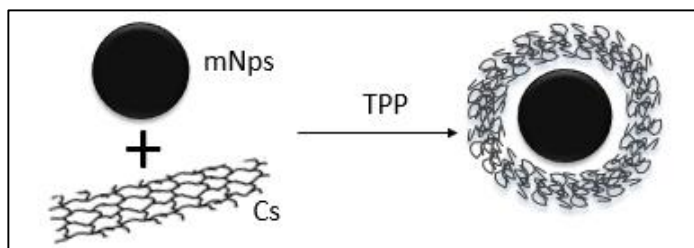


Figura 4.1: Esquema representativo da formação das mNPs de Fe₃O₄ revestidas por Cs.

4.6. Encapsulamento da doxorrubicina (Dox) nas Npm's sem quitosano (Cs)

Foi estudado o encapsulamento do fármaco, a doxorrubicina (Dox), nas mNPs, para diferentes proporções de fármaco relativamente às mNPs. Este estudo foi feito com e sem Quitosano. O procedimento seguinte é referente ao estudo sem Quitosano, com e sem tensioativos. Foram realizadas três réplicas de cada ensaio.

O protocolo utilizado foi uma adaptação do estudo feito em 2011 por *S.Nigam et al* [47] com a inclusão do estudo para diferentes massas de Dox.

4.6.1.Materiais

mNPs (produzidas anteriormente), cloridrato de doxorubicina (*European Pharmacopocia Reference Standard*), água destilada.

4.6.2.Procedimento

A 1 ml de solução aquosa de mNPs ([Nps] = 10 mg/ml) juntaram-se 2 ml de uma solução aquosa de Dox com diferentes concentrações ([Dox] = 0,25, 0,5, 1, 2 mg/ml) e colocou-se 1h em agitação orbital, no escuro. De seguida colocou-se um íman sob as soluções, esperou-se a deposição das mNPs e retirou-se o sobrenadante. Acrescentou-se água às mNPs e repetiu-se o passo anterior. Por fim, mediu-se as absorvâncias dos sobrenadantes retirados, no espectrofotómetro, a 480 nm. A utilização deste valor é justificada pela elaboração da retas de calibração da Dox nos respetivos meios, onde foi possível verificar um pico de absorvância a 480nm.

4.7. Encapsulamento da doxorubicina nas mNPs com quitosano (Cs)

Neste encapsulamento foi mantida a proporção de mNPs relativamente ao Cs e ao TPP, alterando a proporção destas relativamente à Dox (Figura 4.2). Foram realizadas três réplicas de cada ensaio.

4.7.1.Materiais

mNPs (produzidas previamente), cloridrato de doxorubicina (*European Pharmacopocia Reference Standard*), Cs, TPP (*SIGMA-Aldrich*), água destilada.

4.7.2.Procedimento

Fez-se uma solução aquosa de mNPs, [mNPs] = 2,7 mg/ml. Utilizando uma solução aquosa de ácido acético (1% V/V), dissolveu-se o Cs (2% m/V). De seguida juntaram-se 0,4 ml da solução de mNPs com 0,6 ml da solução de Cs e 2 ml de Dox com diferentes concentrações ([Dox] = 0,150, 0,375, 0,750, 1,5, 2 mg/ml). Juntou-se 1ml da solução anterior a 3ml de TPP (0,25% m/V)

e em simultâneo ligou-se o *Turrax (IKA T10 basic)* na velocidade 2, durante 5 minutos. Colocou-se a solução anterior em agitação orbital durante 1h, no escuro e de seguida centrifugou-se a solução na centrífuga (*Heraeus Multifuge X1R, Thermo Scientific*) a uma velocidade de 10000 RPM durante 10 minutos e a 20°C. Por fim, mediram-se as absorvâncias dos sobrenadantes no espectrofotómetro, a 480 nm.

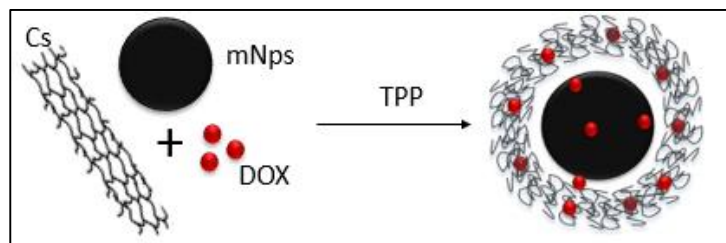


Figura 4.2: Esquema de encapsulamento da Dox em mNPs revestidas com Cs.

4.8. Ensaios de libertação da doxorrubicina

Foi estudada a libertação da doxorrubicina a 37 °C, ao longo de 72h, para meios com três pH diferentes (pH = 4,5, 6,5 e 7,4). Esta técnica foi aplicada aos três tipos de mNPs produzidos, com e sem Cs. Para além disso foi estudada também a libertação em mNPs com Cs e liofilizadas previamente. No total, correspondem a 27 ensaios distintos. Foram realizadas ainda três réplicas de cada ensaio. Todos os ensaios foram realizados nas mesmas condições e com uma quantidade inicial de Dox de 1 mg. O protocolo utilizado é uma adaptação do protocolo de libertação já realizado em 2009 por *Li et al* [48]. Na Tabela 4.1 encontra-se uma síntese dos ensaios de libertação realizados.

Tabela 4.1 Esquema dos ensaios de liberação de fármaco realizados.

Tipos de NPs	Liofilização	Revestimento com Cs	pH
Sem tensioativo	x	x	4.5 6.5 7.4
	✓	✓	
	✓	✓	
Citrato de sódio	x	x	
	✓	✓	
	✓	✓	
Ácido oleico	x	x	
	✓	✓	
	✓	✓	

4.8.1. Materiais

mNPs (produzidas previamente), cloridrato de doxorrubicina (*European Pharmacopocia Reference Standart*), Cs, TPP (*SIGMA-Aldrich*), solução tampão de fosfato (PBS), Ácido Acético (*Pan-reac*), acetato de sódio, NaAc (*Scharlau*), água destilada.

4.8.2. Procedimento

4.8.2.1. Liberação da Dox nas mNPs sem Cs

Numa membrana de diálise com permeabilidade de 10-12 KDa (*Spectrum Laboratories*) colocou-se 1 ml de solução aquosa contendo 5mg de mNPs e 1 mg Dox, a pH 7,4. Essa membrana foi colocada em frascos com 10 ml de solução de:

- I. HAc/NaAc, pH =4,5
- II. PBS, pH = 6,5
- III. PBS, pH = 7,4

Os frascos foram colocados num banho de água a 37 °C para iniciar a liberação da Dox através da membrana para a solução envolvente. Ao fim de 10 min foram retirados 3 ml da solução do meio de liberação (já com Dox) e repôs-se com 3 ml da mesma solução (nova). Mediu-se a absorvância, a 480 nm da amostra retirada.

O passo anterior foi repetido ao longo de 72h, para diferentes intervalos de tempo;

4.8.2.2. Libertação da Dox nas mNPs com Cs

Fez-se uma solução de 1,5 ml contendo 6mg de Cs, 0,54 mg de mNPs e 1 mg de Dox e adicionou-se 4,5 ml de TPP (0,25% m/V) ligando simultaneamente o *Turrax (IKA T10 basic)* na velocidade 2, durante 5 min. Centrifugou-se a solução obtida usando a centrífuga (*Heraeus Multifuge X1R, Thermo Scientific*) a 12 000 rotações por minuto (RPM), durante 10 min. No fim retirou-se o sobrenadante, adicionou-se de água destilada (3 ml) e centrifugou-se nas mesmas condições. Ressuspendeu-se o *pellet* em 1ml de PBS, pH 7,4 e colocou-se na membrana de diálise com permeabilidade de 10-12 KDa (*Spectrum Laboratories*). O restante procedimento foi realizado como no procedimento anterior (4.8.2.1).

4.8.2.3. Libertação da Dox nas mNPs com Cs liofilizadas

Fez-se uma solução de 1,5 ml contendo 6mg de Cs, 0,54 mg de mNPs e 1 mg de Dox à qual se adicionou 4,5 ml de TPP (0,25% m/V) e ligou-se o *Turrax (IKA T10 basic)* na velocidade 2, durante 5 min. Após congelar a solução com azoto líquido, liofilizou-se (*VaCo 2, ZIRBUS technology*) a -43 °C e pressão de 0,07mbar, durante 24h. As amostras obtidas foram ressuspensas em 1 ml de PBS, pH 7,4. Colocou-se na membrana de diálise com permeabilidade de 10-12 KDa (*Spectrum Laboratories*). O restante procedimento foi realizado como o anterior.

4.9. Ensaios realizados em hipertermia

Foram realizados ensaios em hipertermia, utilizando os três tipos de mNPs produzidas, com e sem Cs. Para as mNPs com Cs foram testadas amostras com e sem liofilização prévia. Estes ensaios foram realizados com o objetivo de determinar o *SAR* e o *ILP* das mNPs (conceitos explicados no capítulo 2 deste trabalho).

O equipamento utilizado foi da marca *nB NanoScale Biomagnetics*, modelo *DM100 System DMC1* e está representado na Figura 4.3.



Figura 4.3: Esquema dos diferentes componentes do equipamento de hipertermia utilizado: (1) controlador (2) aplicador; (3) bomba de vácuo; (4) *Chiller*

O equipamento é constituído então por quatro componentes, sendo eles o controlador, onde se define os parâmetros dos ensaios, o aplicador, local onde é colocada a amostra, a bomba de vácuo e o *Chiller*, sistema de refrigeração.

Para os ensaios foi utilizado 1 ml de solução de mNPs, com diferentes concentrações. Assim, a massa de mNPs presente variou entre 0,25 e 5mg. Foram realizadas três réplicas de cada ensaio. Os parâmetros utilizados nos ensaios encontram-se na Tabela 4.2.

Por fim, os dados foram armazenados e posteriormente tratados recorrendo ao *software ZAR v1.0*.

Tabela 4.2 Parâmetros utilizados em todos os ensaios realizados em hipertermia

Parâmetros utilizados		
Intensidade do campo magnético	Frequência	Tempo de aplicação do campo
300 Gauss	418,5 KHz	10 Minutos

4.10. Ensaios de citotoxicidade

Foram realizados ensaios de citotoxicidade para os três tipos de mNPs, com e sem Cs.

Os ensaios foram realizados em dois tipos de células, as VERO (fibroblastos) e as Saos-2 (osteoblastos).

O meio de cultura, utilizado ao longo de todos os ensaios, foi o DMEM (*Sigma Aldrich*) para as células VERO e o McCoy 5A (*Sigma Aldrich*) para as Saos-2. Ambos os meios foram previamente

suplementados com 10% de soro fetal de bovino (*Life Technologies*) e 1% de antibiótico, Penicillin-Streptomycin, 10 000 U/ml (*Life Technologies*). O DMEM contém ainda piruvato de sódio, 10 mM (*Life Technologies*) e GlutaMAX (*Life Technologies*)

4.10.1. Procedimento

4.10.1.1. Descongelação das células

Adicionaram-se 4 ml de meio de cultura com 10% de soro a 1 ml de meio de congelação com células. Transferiram-se os 5 ml resultantes do passo anterior para um frasco de cultura celular T25 e colocou-se na incubadora a 37 °C com uma atmosfera a 5% de CO₂. Mudou-se o meio para eliminar vestígios de meio de congelação.

4.10.1.2. Sementeira das células nas placas

Removeu-se o meio do T25, lavou-se de seguida com PBS, adicionou-se 500 µL de Tripsina ao T25 e colocou-se na incubadora durante 5 min. Adicionou-se novo meio de cultura e procedeu-se à contagem das células no microscópio. Numa placa de 96 poços colocou-se 100 µL em cada poço, correspondendo a 5000 células por poço. Por fim, colocou-se a placa na incubadora durante 24h.

4.10.1.3. Incorporação das mNPs nas células

Diluíram-se as mNPs em meio celular com 1% de antifúngico, de forma a obter as concentrações desejadas e fez-se ainda uma solução de meio com 10% de DMSO para o controlo positivo. Aspiraram-se as placas sem tocar no fundo para não afetar as células, colocando-se, de seguida, 100 µL de mNPs em cada poço. No final colocou-se a placa na incubadora durante mais 24h;

4.10.1.4. Determinação da viabilidade celular pelo método da resazurina

Os poços foram aspirados e lavados cuidadosamente com PBS (contendo Cálcio e Magnésio) de forma a remover a totalidade das mNPs. De seguida adicionaram-se 100 µL de meio com 10% de resazurina a cada poço, deixando na incubadora durante 2h. Após este período, mediu-se a absorvância do meio contido nos poços a 570 e a 600 nm.

4.11. Ensaios de citotoxicidade em hipertermia

Foram realizados ensaios de citotoxicidade das mNPs, desta vez com aplicação de hipertermia. Para tal foi utilizado o equipamento de hipertermia referido anteriormente, assim como os parâmetros referidos.

4.11.1. Procedimento

Inicialmente foram realizados os passos de descongelamento das células e sementeira nas placas já descritos no ponto 4.10.1., com a variância de que a sementeira foi feita nos frascos de hipertermia, com um volume de 1 ml e 40 000 células por frasco, De seguida colocaram-se 100 µL de resazurina em cada frasco, deixou-se 2h na incubadora e mediu-se a absorvância desse meio a 570 e 600 nm. Após esta medição colocou-se em cada frasco 1 ml de mNPs, diluídas em meio celular com 1% de antifúngico, submetendo, de imediato, as amostras aos ensaios de hipertermia, até uma temperatura máxima de 43 °C. Finalizados estes ensaios aspiraram-se as mNPs dos frascos, lavando-os cuidadosamente com PBS (com cálcio e magnésio) de forma a eliminar os vestígios das mesmas. Colocou-se então 1 ml de meio com 1% de antifúngico em cada frasco e deixou-se a incubar durante 24h. No dia seguinte colocaram-se 100 µL de resazurina em cada frasco e deixou-se 2h na incubadora, medindo-se de seguida a absorvância desse meio a 570 e a 600 nm.

4.12. Caracterização das mNPs

4.12.1. Espetroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

De forma a identificar os compostos químicos presentes nas mNPs, produzidas ao longo deste trabalho, recorreu-se à técnica de ATR-FTIR. Esta técnica foi realizada no espectrofotómetro ATR-FTIR Nicolet 6700 – *Thermo Electron Corporation Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared spectrometer*. As amostras utilizadas foram sujeitas a liofilização prévia.

4.12.2. Análise morfológica por Microscopia Electrónica de Transmissão (TEM)

Recorreu-se à análise morfológica por TEM para avaliar a morfologia e tamanho das nanopartículas de magnetite. Esta análise é realizada a uma pequena quantidade de nanopartículas em suspensão, colocadas numa rede de carbono, deixando evaporar o solvente completamente. A análise foi realizada no Instituto Superior Técnico e o equipamento utilizado foi o *Hitachi H-8100 II*, com emissão termiónica, LaB6, e resolução ponto a ponto de 2,7 Å.

4.12.3. Análise Termogravimétrica (TGA)

Esta técnica permite determinar a perda de massa de uma amostra, quando submetida a uma certa temperatura, devido à evaporação do solvente residual e degradação dos seus constituintes por pirólise.

O equipamento utilizado foi o *NETZSCH*, modelo *STA 449F3*, utilizando temperaturas entre 10 e 900 °C, velocidade de aquecimento de 10 °C/min, sob atmosfera de azoto.

5. Análise e discussão de resultados

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos ao longo de todo o trabalho.

5.1. Despolimerização do Quitosano (Cs)

Para aplicação neste trabalho era necessário um Cs com um peso molecular de aproximadamente 30 KDa. Para tal despolimerizou-se o Cs existente em laboratório (480 KDa), pelo procedimento descrito no capítulo 4 deste trabalho.

A determinação do peso molecular foi feita por viscosimetria capilar. Para tal recorreu-se à equação de Mark-Houwink Sakurada (equação 6) [45]. Esta equação relaciona a viscosidade da solução com o peso molecular do polímero, da seguinte forma:

$$[\mu] = K(M_v)^a \quad (\text{Equação 6})$$

Onde μ representa a viscosidade intrínseca da solução, M_v o peso molecular médio viscosimétrico do polímero, a e K são constantes correspondentes a 0,97 e $2,14 \times 10^{-5}$, respetivamente.

Assim sendo e aplicando a equação acima enunciada para os resultados de viscosidade obtidos, o peso molecular do Cs resultante das despolimerizações foi de $[28 \pm 3]$ KDa.

Este Cs foi o único utilizado ao longo de todo o trabalho.

5.2. Nanopartículas magnéticas de Óxido de Ferro (mNPs)

A produção de mNPs de Fe_3O_4 é de extrema importância, pois é a partir daqui que se desenrola o restante trabalho. Estas mNPs vão ser utilizadas como agentes transportadores de fármaco,

permitindo os estudos de encapsulamento e libertação do mesmo, em diferentes pH. Serão ainda sujeitas a ensaios de hipertermia, avaliando a sua capacidade de gerar calor. Por fim serão ainda sujeitas a ensaios de citotoxicidade em duas culturas celulares diferentes. O método de síntese utilizado foi a precipitação química (ou co-precipitação) e consiste na precipitação do Fe^{3+} e Fe^{2+} em solução aquosa, pela ação de um agente precipitante (amónia). É o método mais comumente utilizado para este efeito devido às suas vantagens, tais como baixa temperatura de reação, rapidez do processo, baixo custo associado e pelas propriedades hidrofóbicas das nanopartículas resultantes [44].

As mNPs têm tendência para se agregarem em solução aquosa e sedimentarem rapidamente. Assim, surge a necessidade do recurso a um revestimento que modifique a sua superfície e promova a sua estabilização em meio aquoso. Este pode ser de natureza orgânica, como polímeros, ou mesmo inorgânica. A sua função não passa apenas por estabilizar as mNPs em solução mas também conferir uma superfície que possa ser conjugada com biomoléculas para possíveis aplicações biomédicas [47].

Assim, neste trabalho foram produzidas mNPs de magnetite, Fe_3O_4 , revestidas com dois tensioativos diferentes, sendo eles o Citrato de Sódio (CT) e o Ácido Oleico (AO). As concentrações usadas foram de 10 e 64 mM, respetivamente. Estes são os três tipos de mNPs referidas ao longo do trabalho.

Cada um deste tipo de mNPs foi utilizado com e sem revestimento. O revestimento utilizado é o Cs despolimerizado com um peso molecular de $[28 \pm 3]$ KDa. A Tabela 5.1 apresenta uma síntese dos diferentes tipos de mNPs produzidos e a aplicação delas ao longo do trabalho.

Tabela 5.1: Esquema das diferentes mNPs produzidos e as suas aplicações neste trabalho.

mNPs	Tensioativos	Revestimento com Cs	Aplicações neste trabalho
Fe_3O_4	-	×	Encapsulamento e libertação de fármaco;
		✓	
	CT	×	Ensaio de hipertermia;
		✓	Ensaio de citotoxicidade das mNPs;
	AO	×	Ensaio de citotoxicidade com hipertermia.
		✓	

A escolha dos tensioativos e das concentrações tem como base um trabalho realizado por A. Alves, onde é estudada a presença de diferentes tensioativos e a concentração ótima dos mesmos relativamente a alguns parâmetros, como a estabilidade, solubilidade e agregação das mNPs em solução [49].

Relativamente ao uso do quitosano (CS) como revestimento das mNPs, este é justificado pelas suas características de grande interesse já enumeradas, tais como ser biocompatível, biodegradável e ter baixa toxicidade [50]. O polímero utilizado, o seu peso molecular e proporções com as mNPs têm como base um estudo do Cs que está a ser desenvolvido num trabalho paralelo, que ainda se encontra em desenvolvimento.

As mNPs produzidas neste trabalho foram caracterizadas por FTIR, TGA e TEM. Os resultados são apresentados de seguida.

5.2.1.FTIR

Na Figura 5.1 apresenta-se um espectro de FTIR das mNPs produzidas neste trabalho sem revestimento e com os dois tensioativos utilizados. Com esta caracterização é possível determinar as principais ligações químicas presentes nas nanopartículas de Fe_3O_4 , assim como a presença dos tensioativos, através das ligações estabelecidas.

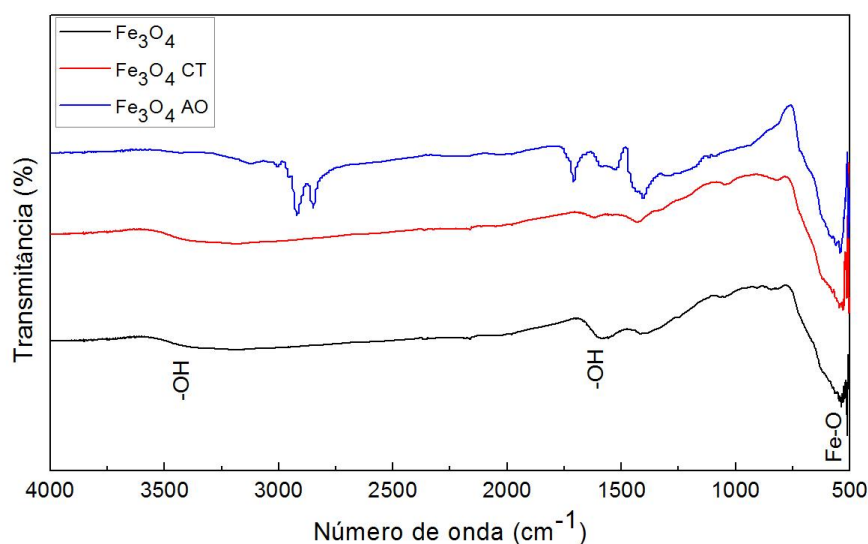


Figura 5.1: Espectro de FTIR das mNPs de Fe_3O_4 sem tensioativo (Fe_3O_4), com CT (Fe_3O_4 CT) e com AO (Fe_3O_4 AO).

O espectro de FTIR do Fe_3O_4 confirma a presença de três bandas características desta molécula, a 560 cm^{-1} , 1630 cm^{-1} , e entre 3400 e 3100 cm^{-1} . A forte absorção da banda a cerca de 560 cm^{-1} é atribuída à vibração da ligação Fe-O, confirmando assim a presença de um óxido de ferro. A banda a 1630 cm^{-1} é relativo a uma ligação O-H que reflete a presença de um grupo hidroxilo. A banda, entre os 3400 e 3100 cm^{-1} reflete uma vibração da ligação O-H devida à presença de água [51].

Pela análise da Figura 5.1 é também possível estabelecer uma comparação entre as mNPs sem e com tensoativo, CT e AO, sendo possível confirmar a presença das bandas características do Fe_3O_4 em todos os espectros.

O espectro de FTIR do Fe_3O_4 , revestido com CT revela duas bandas, a cerca de 1434 e 1610 cm^{-1} , características da ligação COO-Fe , que se podem justificar pela reação de radicais do grupo hidróxido, que se encontra na superfície do Fe_3O_4 , com o anião carboxilato do citrato de sódio. A presença destas bandas de CT nas mNPs confirma que efetivamente se estabeleceu a ligação do citrato de sódio ao óxido de ferro. No entanto, como se verifica, estas aparecem com uma baixa intensidade, podendo ser justificada pela baixa concentração usada de citrato de Sódio, 10 mM [50, 51].

Relativamente ao espectro de FTIR do Fe_3O_4 revestido com AO, as bandas observadas a 1530 e 1408 cm^{-1} são devidas, respetivamente, às vibrações de alongamento simétricas e assimétricas do $-\text{COO}^-$. A banda a 1710 cm^{-1} é característica de uma estrutura em bicamada (com uma superfície hidrofóbica e outra hidrofílica) do tensoativo, tornando-se visível a ligação C=O . Esta estrutura e consequentemente a presença desta banda no espectro de FTIR só é verificada para concentrações de AO a partir de 64 mM, o que corresponde à concentração usada neste trabalho. A presença de duas camadas na molécula de ácido oleico, em que a parte hidrofóbica está ligada à superfície da molécula de Fe_3O_4 e a parte hidrofílica está virada para o exterior, é essencial para a solubilidade e estabilidade da molécula em meio aquoso. As bandas a 2920 e 2848 cm^{-1} são atribuídas às ligações simétricas e assimétricas do CH_2 , presente no AO. A banda a cerca de 1310 cm^{-1} corresponde à ligação do CH_3 [35]. As bandas aqui verificadas têm uma maior intensidade do que as verificadas na presença de CT, pois a concentração de AO é mais elevada, 64mM, comparativamente à anterior, 10mM.

Os espectros de FTIR da Figura 5.2 correspondem às mNPs de Fe_3O_4 revestidas com Cs. Está também representado o espectro de FTIR do Cs, como referência para os outros três espectros. Neste espectro é confirmada a presença das bandas características do Cs. A banda a 3300 cm^{-1} representa uma combinação das vibrações de ligação do grupo OH e NH_2 . As bandas a 1650 e a 1571 cm^{-1} correspondem, respetivamente, à ligação de vibração do grupo CONH_2 e NH_2 . Verifica-se também a presença de uma banda a 1320 cm^{-1} , referente a uma ligação amida. Por fim, as bandas a 1030 e 1150 cm^{-1} correspondem à vibração de ligações do C-O-O [49, 52].

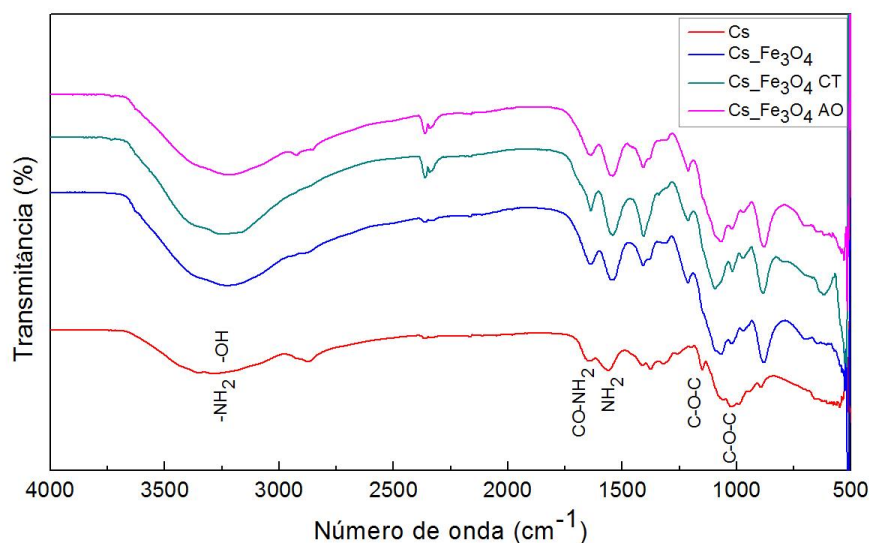


Figura 5.2: Espectro de FTIR do Cs e das diferentes mNPs de Fe_3O_4 revestidas com Cs: sem tensioativo ($\text{Cs_Fe}_3\text{O}_4$), com CT ($\text{Cs_Fe}_3\text{O}_4$ CT) e com AO ($\text{Cs_Fe}_3\text{O}_4$ AO)

Relativamente ao espectro das do Cs ligado às mNPs de óxido de ferro, verifica-se que a banda presente no Cs a 3300 cm^{-1} , correspondente à ligação de vibração do grupo OH, sofreu uma intensificação do seu valor quando o Cs está ligado às mNPs. Esta intensificação da banda pode indicar que foi efetivamente estabelecida uma ligação entre as duas moléculas, visto que, segundo a literatura, as mNPs ligam-se aos grupos OH do Cs. Esta conclusão é apoiada pelo surgimento de uma banda nos espectros de Cs com mNPs, a cerca de 510 cm^{-1} atribuída à ligação Fe-O, indicativo da presença de Fe_3O_4 . Estas observações estendem-se também ao espectro do Cs ligado às mNPs revestidas com CT e AO, como se pode verificar na figura. Em suma, pode-se afirmar que a molécula de Cs foi efetivamente ligada às mNPs de Fe_3O_4 [40].

5.2.2.TEM

Na Figura 5.3 está representada uma imagem de TEM das mNPs de Fe_3O_4 sintetizadas neste trabalho. As partículas apresentam forma esférica com um diâmetro médio de $[8 \pm 2]\text{ nm}$ e alguma aglomeração, o que já era esperado, devido às propriedades hidrofóbicas das mNPs e a tendência natural para se agregarem na ausência de tensioativo.

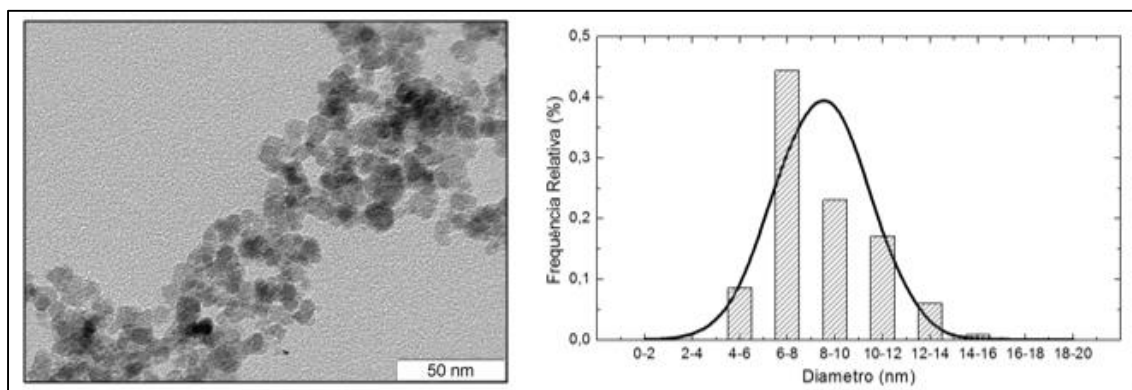


Figura 5.3: Imagem de TEM para as mNPs de Fe_3O_4 e respetiva distribuição de tamanho das partículas.

5.2.3.TGA

A análise termogravimétrica fornece-nos a perda de massa de um dado material com o aumento da temperatura. Assim, foi utilizada para analisar os compostos químicos presentes nas mNPs produzidas neste trabalho, pela análise dos espectros obtidos, comparando-os com a literatura.

Os valores dos picos, referidos de seguida, foram obtidos pelo gráfico das respetivas derivadas. Na Figura 5.4 está representado o termograma das mNPs de Fe_3O_4 sem tensioativo, com CT e com AO.

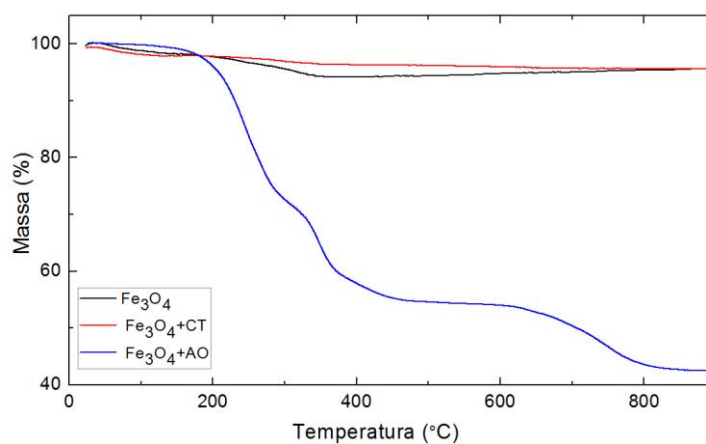


Figura 5.4: Termogramas das mNPs de Fe_3O_4 sem tensioativo (Fe_3O_4), com CT ($\text{Fe}_3\text{O}_4+\text{CT}$) e com AO ($\text{Fe}_3\text{O}_4+\text{AO}$)

Pela análise dos termogramas da Figura 5.4 é possível verificar uma perda de massa de 1,58% para as mNPs de Fe_3O_4 , a uma temperatura de 160 °C, que pode ser atribuída à perda de água. Verifica-se também uma perda de 2,54 % de massa a 320 °C, devido à oxidação de Fe_3O_4 para Fe_2O_3 .

Relativamente às mNPs com CT, o termograma é idêntico ao anterior. A perda de massa a partir dos 160 °C é mais gradual, devido à presença de citrato à superfície, o que atrasa a oxidação do Fe_3O_4 , podendo esta perda de massa dever-se à remoção das moléculas de citrato, presentes na superfície. A inexistência de indícios de perda de citrato livre, leva a concluir que o Citrato está ligado às mNPs, como já verificado com os resultados de FTIR [53, 54].

Para as mNPs revestidas com AO verifica-se uma perda de massa inicial de 12% entre 140 e 200 °C, corresponde ao AO livre, ou seja, que não está a revestir a nanopartículas. O segundo patamar, entre os 200 e 500 °C corresponde à perda de massa do AO que está efetivamente ligado à superfície das mNPs e representa uma perda de 34% da massa. Estas duas primeiras perdas de massa podem levar à produção de gases redutores. Assim sendo, a última perda de massa de cerca de 12%, entre os 600 e 780 °C, pode ser justificada pela redução do Fe_3O_4 . No total, as mNPs revestidas com AO apresentam uma perda de massa de 50% em que apenas 12% correspondem à degradação do AO livre, corroborando os resultados de FTIR, que indicam que o AO está ligado à superfície das mNPs [35].

Na Figura 5.5 estão representados os termogramas do Cs e das respetivas mNPs revestidas com Cs. Relativamente ao Cs, é possível verificar uma perda de massa de 11% a 180°C, referente à perda de água, quer absorvida, quer à superfície do polímero. De 250 a 400°C verifica-se a segunda perda de massa, 38%, devido à degradação da cadeia polimérica do Cs, com a evaporação dos compostos voláteis. Nas restantes mNPs esta segunda perda é verificada de forma mais gradual, o que pode ser justificado pela presença do TPP na ligação do Cs às mNPs. Por fim verifica-se uma perda de massa de 28%, correspondendo à degradação residual do Cs reticulado. No total, verifica-se uma perda de massa de 77%. Os termogramas das restantes mNPs revestidas com Cs apresentam um comportamento semelhante ao do Cs. No entanto têm valores de massa residual superiores relativamente ao Cs sozinho. Esta menor perda de massa está relacionada com a presença do Fe_3O_4 que se encontra revestido pelo Cs e não é degradado [55, 56].

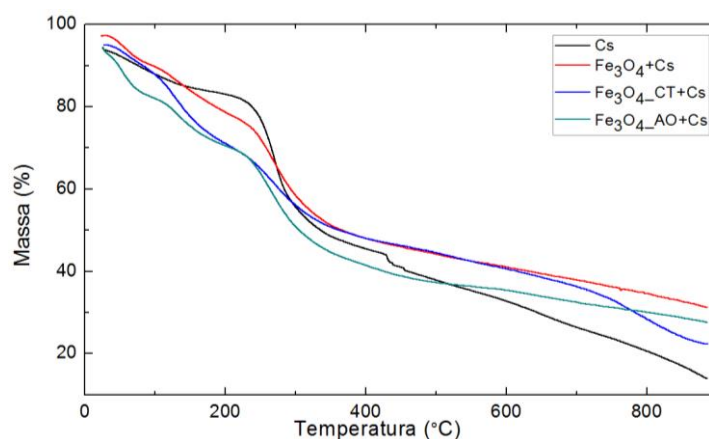


Figura 5.5: Termograma do Cs e das mNPs de Fe_3O_4 revestidas com Cs, sem tensioativo ($\text{Fe}_3\text{O}_4+\text{Cs}$), com CT ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CT}+\text{Cs}$) e com AO ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-AO}+\text{Cs}$)

5.3. Encapsulamento do fármaco nas mNPs

Antes de iniciar os estudos de liberação de fármaco, foi estudado o encapsulamento do mesmo nos diferentes tipos de mNPs. O fármaco utilizado foi a doxorrubicina (Dox). O objetivo era determinar o efeito dos tensioativos e do revestimento com Cs, assim como a massa de Dox que maximizasse a eficiência de encapsulamento (EE), de forma a utilizar esta massa no processo de liberação. Os resultados, representados na Figura 5.6, foram obtidos pela medição da absorvância dos sobrenadantes a 480 nm e pela aplicação da equação 7 (resultante da reta de calibração da Dox elaborada) para o cálculo da massa de Dox que não foi encapsulada, ou seja, presente nos sobrenadantes analisados.

$$Abs = 0,0178 [Dox] - 0,0011 \quad (\text{Equação 7})$$

Em que *Abs* é dado pela absorvância da Dox a 480 nm e *[Dox]* é a concentração de Dox presente na amostra, em mg/ml.

Finalmente, pela aplicação da equação seguinte, obteve-se então a eficiência de encapsulamento.

$$EE (\%) = \left(\frac{\text{massa Dox inicial} - \text{massa Dox no sobrenadante}}{\text{massa de Dox inicial}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 8})$$

Pela observação do gráfico da Figura 5.6 a) é possível verificar que para as mNPs sem tensioativo não são verificadas diferenças significativas de EE entre as diferentes massas de Dox. Para as mNPs com CT, há um decréscimo da EE à medida que aumenta a massa de Dox, verificado especialmente entre os 2 e 4 mg de Dox. Nestas duas mNPs verifica-se uma elevada EE, atingindo valores máximos próximos de 100%. Quanto às mNPs com AO verifica-se uma diminuição da EE à medida que a massa de Dox aumenta. Estas mNPs atingem uma EE máxima de 57%.

Analisando o efeito dos tensioativos na EE é visível, numa primeira análise, uma diminuição significativa de EE para as mNPs com AO, relativamente às restantes mNPs, para todas as

massas de Dox. Este facto pode ser justificado pela bicamada formada pelo AO à volta da nanopartícula, o que dificulta a penetração da Dox na mesma. Quanto ao CT, comparativamente com a ausência de tensioativo, só se verifica uma diminuição na EE para 4 mg de Dox. O CT não tem um impacto tão elevado como o AO na EE, provavelmente devido à concentração usada ser inferior (10mM de CT comparativamente a 64mM de AO).

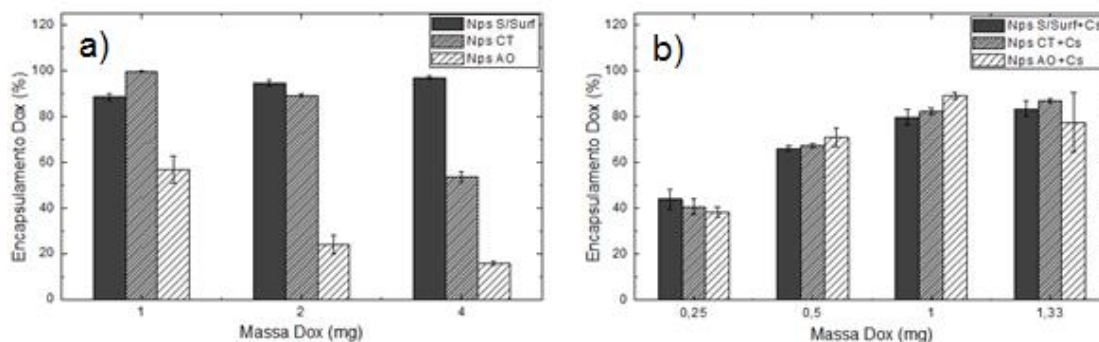


Figura 5.6: Eficiência do encapsulamento do fármaco em função da massa para as mNPs S/Surf, com CT e AO: a) Sem Cs, b) com Cs.

Relativamente ao encapsulamento nas mNPs com Cs, Figura 5.6 b), é possível observar que a EE aumenta com a massa, até 1mg de Dox. Entre 1 e 2 mg de Dox, não existem diferenças significativas na EE. Relativamente ao efeito dos tensioativos nas mNPs revestidas com Cs, não se verifica nenhuma diferença significativa entre o CT e o AO, assim como relativamente à ausência dos mesmos. Esta análise leva à hipótese de que a Dox pode estar encapsulada maioritariamente pelo Cs, sem estar necessariamente no núcleo da nanopartícula de Fe_3O_4 .

Na Tabela 5.2 são apresentados os valores máximos de EE e as respetivas massas de Dox onde se verificam.

Tabela 5.2: Valores de EE máximos e massa de Dox correspondente

Tensioativo	Revestimento com Cs	EE máxima (%)	Massa de Dox (mg) para EE máxima	Concentração de Dox (mg/ml) para EE máxima
x	x	97 ± 1	4	2
	✓	84 ± 3	1,33	2
CT	x	100 ± 1	1	0,5
	✓	87 ± 1	1,33	2
AO	x	57 ± 6	1	0,5
	✓	89 ± 1	1	0,5

Pela análise da Figura 5.6 e da tabela anterior verifica-se, por último, que a eficiência de encapsulamento máxima nem sempre ocorre para a massa de Dox mais elevada. Este facto pode ser explicado pela existência de saturação, ou seja, as mNPs já não têm capacidade para encapsular mais Dox, ficando assim desperdiçada no sobrenadante. Assim sendo e com o objetivo de minimizar a quantidade de Dox a ser utilizada nas libertações, a massa de Dox definida para as mesmas foi então de 1mg. Foi definida uma única massa para todas as libertações, de forma a realizar todos os ensaios com os mesmos parâmetros, para possível comparação.

5.3.1. FTIR

Para corroborar o encapsulamento do fármaco (1mg) nas mNPs, foram realizadas análises de FTIR. Na Figura 5.7 está então representado o espectro de FTIR das mNPs após o encapsulamento da Dox.

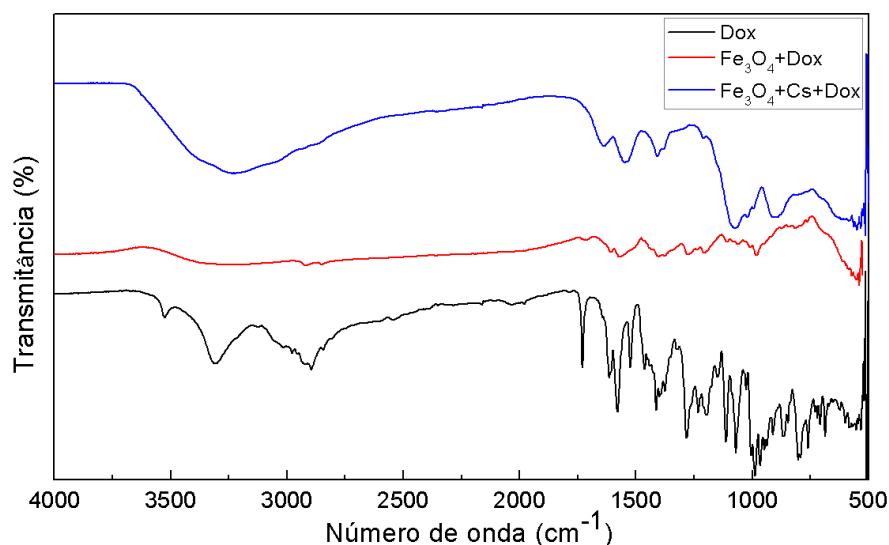


Figura 5.7: Espectro de FTIR da Dox, das mNPs de Fe_3O_4 encapsuladas com Dox ($\text{Fe}_3\text{O}_4+\text{Dox}$) e das mNPs de Fe_3O_4 revestidas com Quitosano e encapsuladas com Dox ($\text{Fe}_3\text{O}_4+\text{Cs}+\text{Dox}$).

No espectro de Dox apresentado é possível verificar bandas características da mesma. A banda a 2980 cm^{-1} representa a vibração de ligação C-H, a 1750 cm^{-1} a ligação C-O, a 1600 e 1510 cm^{-1} a ligação N-H, a 1420 cm^{-1} a ligação C-C e a 1000 cm^{-1} a ligação C-O [58]. É possível verificar que os espectros de Fe_3O_4 e Fe_3O_4 com Cs, carregados com Dox, sofreram alterações relativamente aos espectros das respetivas mNPs apresentados antes do encapsulamento (Figura 5.1 e Figura 5.2). Estas diferenças devem-se à presença da Dox nas mNPs visto que, as bandas da Dox estão representadas nos espectros das mNPs carregadas com Dox, podendo indicar que esta foi efetivamente encapsulada pelas mNPs.

5.3.2.TGA

Na Figura 5.8 é apresentado o termograma das mNPs de Fe_3O_4 encapsuladas com Dox e revestidas com Cs. As perdas de massa das mNPs revestidas com Cs já foram justificadas na secção 5.2.3. Apesar do termograma de Dox livre não estar representado na figura, este foi obtido pela literatura e é apresentado no apêndice A.

Comparando o termograma das mNPs sem e com Dox, é possível verificar que a perda de massa inicial é equivalente nas duas situações. Já a perda de massa devido à degradação da cadeia polimérica do Cs (entre 180 e $400\text{ }^\circ\text{C}$) é diminuída na presença da Dox. Além disso a massa residual é superior na presença de Dox, cerca de 20% . Estes resultados sugerem a ligação da Dox ao polímero visto que, pela literatura, a Dox livre degrada-se apenas 10% na temperatura correspondente ao seu ponto de fusão. Verifica-se então que na presença de Dox o polímero se encontra mais estável, devido à sua menor degradação [59].

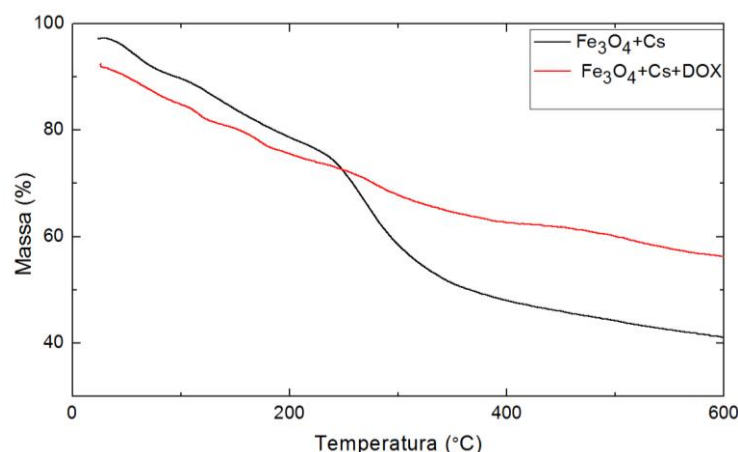


Figura 5.8: Termograma das mNPs revestidas com Cs ($\text{Fe}_3\text{O}_4+\text{Cs}$) e das mNPs revestidas com Cs e com Dox encapsulada ($\text{Fe}_3\text{O}_4+\text{Cs}+\text{Dox}$).

5.4. Ensaios de liberação de fármaco

Existe um grande interesse em associar a liberação de fármacos usados no tratamento do cancro, como a doxorrubicina, a transportadores, nomeadamente as mNPs. Este interesse está relacionado com a possibilidade de conduzir o fármaco até ao local desejado, visto que, devido às suas propriedades magnéticas, pela aplicação de um campo magnético externo, é possível conduzir as mNPs a um local específico do organismo [9]. Se estas transportarem um fármaco, significa que esse fármaco será consequentemente levado até ao mesmo local. Por outro lado, a Dox livre entra nas células por difusão simples, através da membrana celular enquanto, quando transportada por mNPs, esta entrada dá-se por endocitose, o que se tem revelado mais eficiente, não só pela forma como a Dox entra na célula, mas também porque permite uma maior acumulação do fármaco no seu interior [58]. Testes celulares realizados por *Unsoy et al* [58], em culturas celulares de células do cancro da mama, mostram também que a dose letal de Dox a 50 % (DL_{50}) diminuiu significativamente quando esta é transportada por mNPs, ou seja, este processo torna-se mais eficiente, visto não ser necessária uma quantidade tão elevada de fármaco para se dar a morte das células tumorais.

No seguimento desta informação acerca das vantagens no uso de mNPs para o transporte de fármaco até às células tumorais, foram realizados ensaios de liberação de fármaco, Dox, para todos os tipos de mNPs produzidos neste trabalho, sem e com Cs. Neste último caso, realizaram-se também ensaios após liofilização. O recurso à liofilização surge da necessidade de conservação das mNPs a longo prazo. Este método, que consiste em secar as amostras retirando toda a água das mesmas, permite um período de conservação mais prolongado do que em solução [60].

De forma a aproximar o ambiente dos ensaios de libertação ao ambiente celular, estes foram realizados num banho a 37 °C, em meios com três pH diferentes, sendo o primeiro (7,4) aproximadamente o pH do sangue, o segundo (6,5) corresponde ao pH do meio extracelular tumoral e por fim o pH dos lisossomas e endossomas, responsáveis pela endocitose das mNPs nas células (4,5). O interesse em estudar estes pH é justificado pelo facto de que as mNPs carregadas com fármaco podem ser administradas na corrente sanguínea e, com aplicação do campo magnético, serem transportadas até às células tumorais entrando nas mesmas por endocitose [58].

Assim, um dos objetivos dos ensaios de libertação foi verificar a influência do pH na libertação do fármaco. O outro objetivo passa por verificar a influência dos tensioativos, do revestimento com Cs e da liofilização na libertação do fármaco.

Com tudo isto, começou-se por estudar o comportamento da Dox livre (controlo) nos diferentes pH, assim como o seu comportamento quando libertada a partir das mNPs de Fe₃O₄ simples (sem tensioativos e sem revestimento), ao longo de 72 horas. Os resultados de libertação cumulativa de Dox foram obtidos pela medição da absorvância das amostras a 480 nm e pela aplicação das equações 9, 10 e 11 (resultantes das retas de calibração da Dox elaboradas) para os diferentes pH.

<u>pH 4,5:</u>	$Abs = 0,0168 [Dox] + 0,0116$	(Equação 9)
<u>pH 6,5:</u>	$Abs = 0,0192 [Dox] - 0,034$	(Equação 10)
<u>pH 7,4:</u>	$Abs = 0,0186 [Dox] + 0,0179$	(Equação 11)

Em que *Abs* é dado pela absorvância da Dox a 480 nm e [Dox] é a concentração de Dox presente na amostra, em mg/ml.

Analisando o gráfico da Figura 5.9 a) é possível observar que a libertação de Dox livre aumenta com a diminuição do pH, verificando-se uma libertação praticamente total (100%) a pH 4,5 e uma libertação superior a 90% a pH 6,5. Por último, a pH 7,4 existe uma libertação total de cerca de 60%, representando uma grande diminuição na percentagem de libertação, comparativamente aos restantes pH. Estes valores podem ser justificados pelo comportamento da Dox que apresenta estabilidade máxima em pH ácido (entre 4 e 5) [61].

Verifica-se também a existência de um patamar de libertação ao fim de 8 horas, ou seja, a libertação total é atingida ao fim deste período.

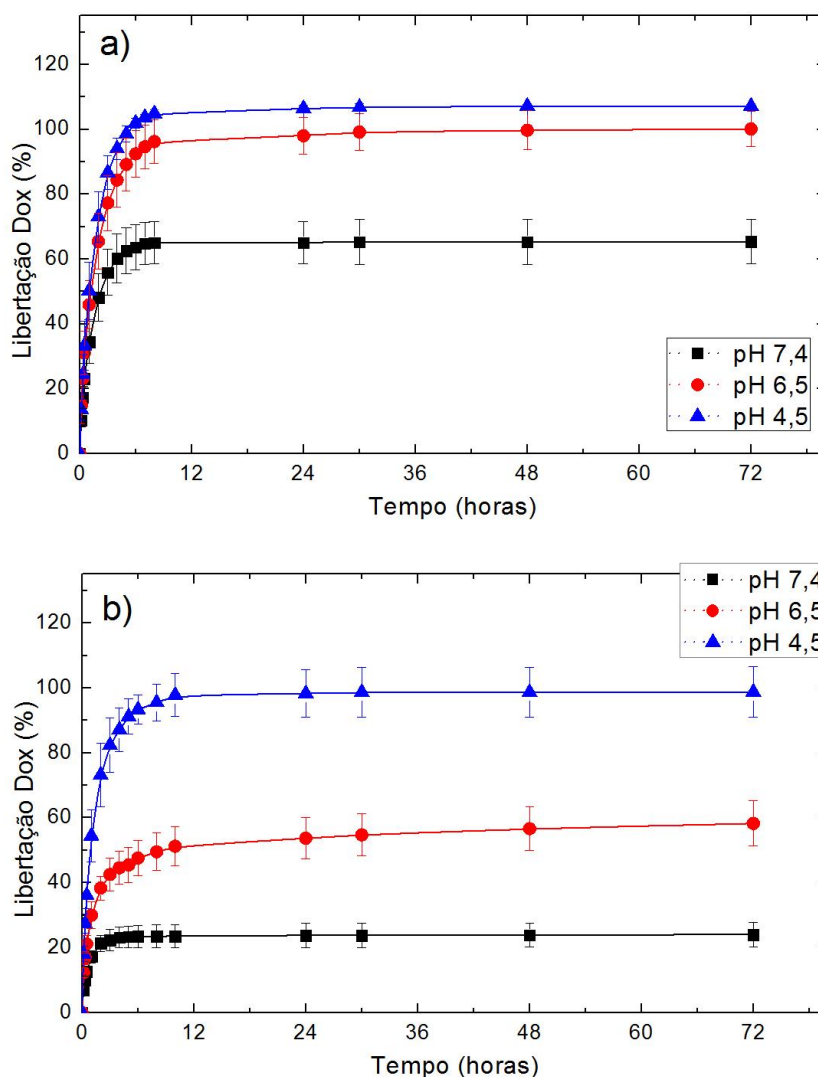


Figura 5.9: Liberação cumulativa de a) Dox livre e b) Dox encapsulada nas mNPs de Fe_3O_4 , em pH 7,4, 6,5 e 4,5, ao longo de 72 horas.

Ainda na Figura 5.9, comparando o gráfico a) com o b) verifica-se que a pH 4,5, comparativamente à Dox livre, existe apenas uma pequena diminuição da quantidade de Dox libertada, atingindo valores de libertação próximos de 100% também na presença de mNPs. No entanto, há uma diminuição significativa da libertação de Dox (cerca de 40%) a pH 6,5 e 7,4, quando encapsulada nas mNPs, relativamente à Dox livre.

Segundo a literatura, estas observações podem ser justificadas pela ligação de uma parte da Dox ao núcleo das mNPs de Fe_3O_4 , o que resulta numa libertação de Dox limitada, devido à ligação estabelecida entre a Dox e a molécula transportadora [62].

Verifica-se também no gráfico b) a existência de um patamar de libertação ao fim das primeiras horas, tal como verificado na Dox livre. Este comportamento na libertação por mNPs pode ser devido à quantidade de Dox não encapsulada ou seja, que se encontra livre, o que leva a uma

libertação inicial muito rápida. Estas conclusões são apoiadas pela bibliográfica que indica a libertação do fármaco se pode justificar por diferentes processos, sendo um deles a dessorção (referente à libertação de Dox que não encapsulou) [58].

A tendência preferencial para a libertação de Dox em pH ácido também é verificada quando esta está encapsulada nas mNPs. Este resultado revela grande interesse na aplicação deste sistema de libertação para tratamentos de cancro, visto que a Dox tem a sua libertação máxima no pH dos lisossomas e endossomas, seguida de uma elevada libertação também no meio extra celular (pH 6,5), aliada a baixos valores de libertação no pH correspondente à corrente sanguínea. Apenas cerca de 20% de Dox é libertada neste pH.

Está assim estabelecida a comparação entre a libertação da Dox livre e a libertação da Dox acoplada a mNPs simples, assim como a influência do pH, nos valores de libertação atingidos. Esta característica de maior libertação em meios com pH ácido também foi verificada para as mNPs com tensioativos e revestida com Cs, como se poderá verificar na análise dos resultados seguintes. São também apresentados no Apêndice B os gráficos de comparação da libertação para estas mNPs, nos diferentes pH.

De seguida, será analisado o efeito da presença dos tensioativos (CT e AO), do revestimento com Cs e do processo de liofilização na libertação de Dox. Na Figura 5.10 estão representados os gráficos de libertação de Dox com a presença de tensioativos, nos diferentes pH.

Numa primeira análise da Figura 5.10 é possível observar que as mNPs revestidas, quer com CT, quer com AO, seguem o modelo de libertação já verificado, com a presença de um patamar de libertação e apresentam sensibilidade ao pH, aumentando a libertação com a diminuição do mesmo. No entanto, relativamente à quantidade de Dox libertada na presença de AO, existem dois cenários distintos. Para um pH de 7,4 a percentagem de Dox libertada na presença deste tensioativo é superior. No entanto, permanece abaixo dos 40%, verificando-se que neste pH a libertação é mínima, como já verificado. Já para o pH de 4,5 e 6,5 a presença do AO leva a uma diminuição na libertação de fármaco. Isto pode ser justificado, uma vez mais, pela presença da bicamada formada pela AO na superfície das mNPs. Assim, quando a Dox se encontra encapsulada no interior da nanopartícula, existe uma maior dificuldade em ser libertada, devido à presença desta bicamada na superfície. Relativamente ao CT, não se verificam alterações significativas na capacidade de libertação de Dox, mantendo valores próximos dos observados nas mNPs simples.

Em suma, entre os dois tensioativos utilizados, apenas se verifica a influência do AO na libertação de fármaco. Esta influência pode ser considerada negativa pois as mNPs com AO, comparativamente às mNPs sem tensioativos, libertam mais fármaco na corrente sanguínea (pH = 7,4), o que não tem interesse para esta aplicação. Além disso, na presença do AO também libertam menos fármaco em pH ácido, nomeadamente dos lisossomas e do meio extracelular, onde a libertação de fármaco deve ser mais elevada.

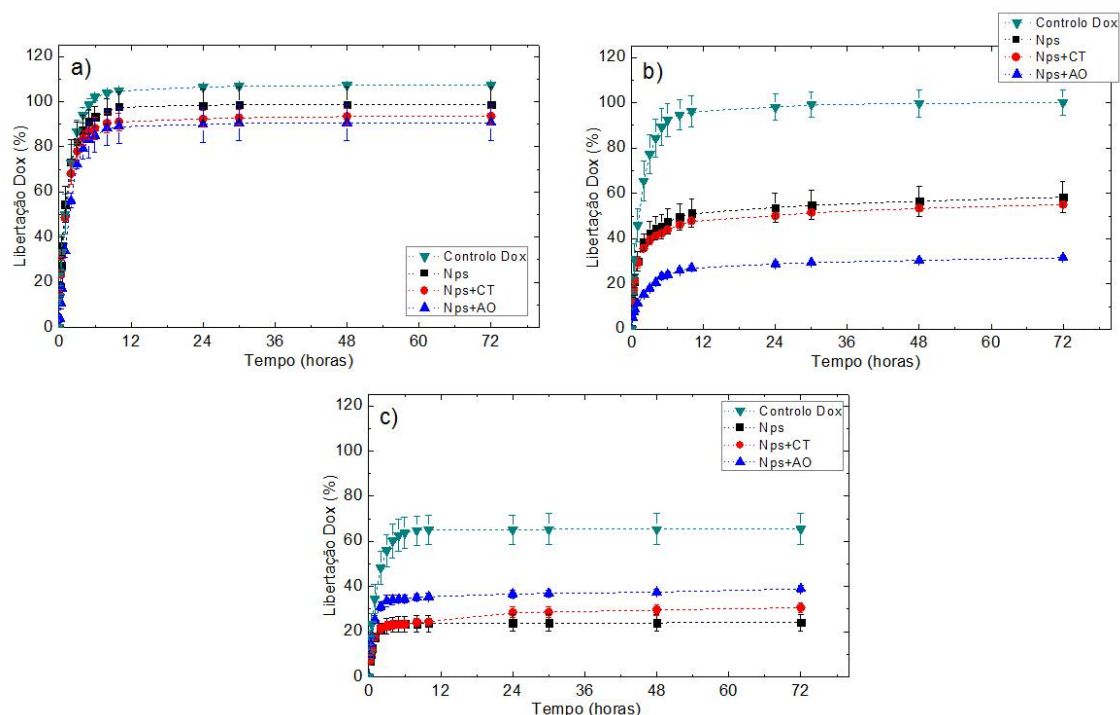


Figura 5.10: Libertação da Dox ao longo de 72h para as mNPs sem tensioativo (Nps), com CT (Nps+CT) e com AO (Nps+AO), em pH: a) 4,5, b) 6,5, c) 7,4

Na Figura 5.11 está representada a liberação de fármaco para todas as mNPs revestidas com Cs, de forma a verificar a influência do mesmo nos valores de liberação, comparativamente aos valores obtidos na figura anterior (libertação sem Cs).

Numa análise geral da figura é possível afirmar que o modelo de liberação verificado nas situações anteriores foi mantido na presença do Cs com a presença de um patamar de liberação ao fim de 12 horas. Comparando a Figura 5.11 com a Figura 5.10 verifica-se que para o pH de 4,5 a presença do Cs não revela influência, dado que os valores sofreram apenas uma ligeira diminuição, mas com valores máximos próximos de 90% de liberação, não se revelando a diferença significativa. Por outro lado, nos meios com pH de 6,5 e 7,4, verifica-se que a liberação aumentou na presença do Cs. Este aumento pode ser justificado pela possibilidade de a Dox, na presença do Cs, ser encapsulada pela matriz polimérica e não pelas nanopartículas de Fe_3O_4 . Se assim for, na presença do Cs esta liberação pode ser superior pois a degradação da matriz polimérica é apontada, na bibliografia, como uma das formas possíveis de liberação de fármaco [58].

Aqui os valores mais elevados também são atingidos para o pH de 4,5. Este resultado está de acordo com o esperado visto que, pela bibliografia sabe-se que quando o Cs se encontra em pH ácido os grupos NH_2 podem ser protonados e a molécula incha, aumentando, consequentemente, a quantidade de Dox libertada [48].

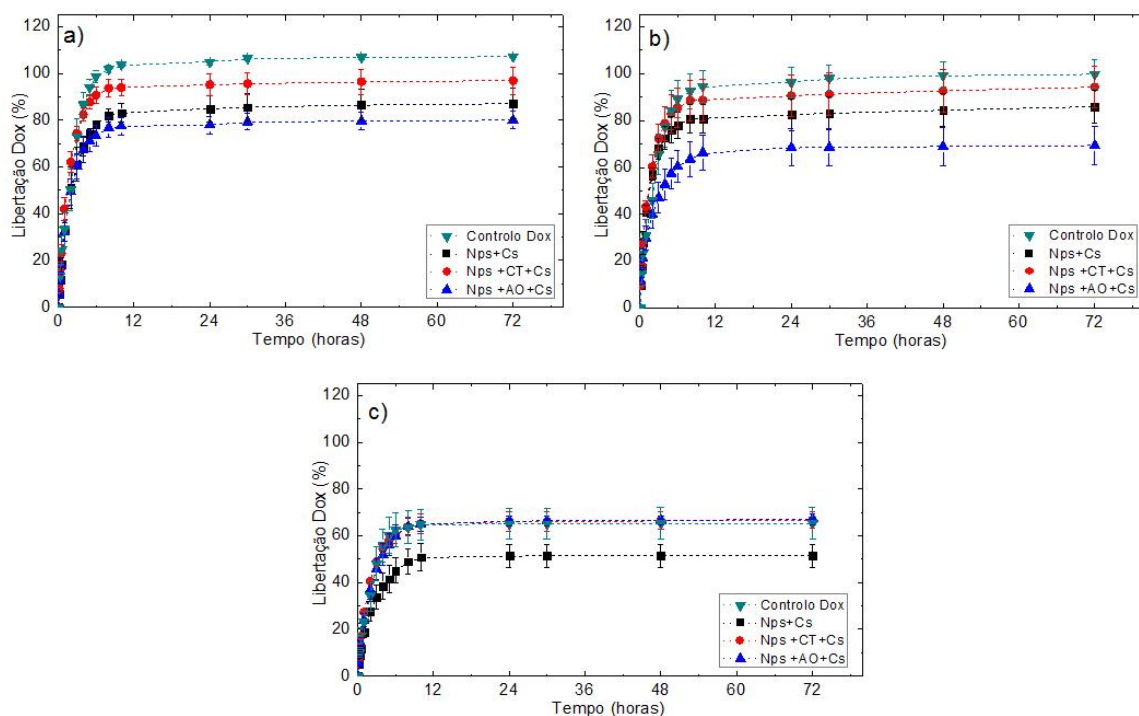


Figura 5.11: Libertação da Dox ao longo de 72h para as mNPs revestidas com Cs, sem tensoativo (Nps+Cs), com CT (Nps+CT+Cs) e com AO (Nps+AO+Cs), em pH: a) 4,5, b) 6,5, c) 7,4

Relativamente ao comportamento das mNPs com tensoativos, a presença de Cs não acrescenta nenhuma informação visto que foi verificado que o AO continua a ter uma libertação mais baixa em meios com pH mais ácido e mais alta no pH de 7,4.

A Figura 5.12 apresenta os resultados de libertação de Dox para as mNPs que foram submetidas ao processo de liofilização. Para estas mNPs há uma alteração do modelo de libertação relativamente ao controlo: o patamar de libertação é atingido entre as 24 e 72 horas, o que se traduz numa libertação inicial mais controlada. Este resultado está de acordo com o esperado, pois o Cs nesta situação está liofilizado e não em solução. Ou seja, o Cs em solução incha, ficando com os interstícios da sua rede maiores. Quando liofilizado, o processo de inchamento só é iniciado quando se começa a libertação, fazendo com que a rede de Cs esteja mais compacta inicialmente, o que leva a uma libertação inicial mais lenta e controlada.

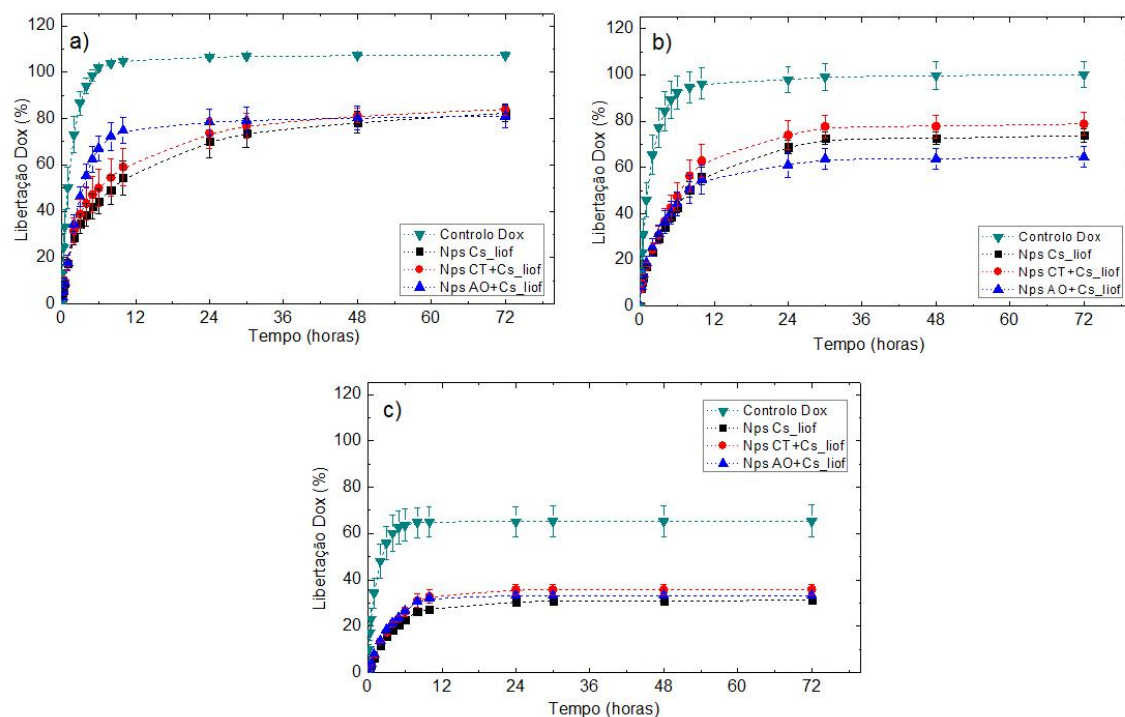


Figura 5.12: Liberação da Dox ao longo de 72h para as mNPs liofilizadas, sem tensioativo (Nps Cs_liof), com CT (NpsCT+Cs_liof) e com AO (NpsAO+Cs_liof), em pH: a) 4,5, b) 6,5, c) 7,4

Aqui é também visível o incremento na percentagem de libertação de fármaco, com a diminuição do pH, em todas as situações, como era esperado. Esta característica é de grande interesse no tratamento do cancro visto indicar que, em condições extracelulares tumorais (pH 6,5), a libertação de fármaco atinge valores significativamente mais elevados do que em condições fisiológicas normais. O mesmo se verifica para o pH dos lisossomas e endossomas, que a libertação de fármaco atinge o seu valor máximo.

5.5. SAR e ILP das mNPs produzidas

Como já referido no capítulo 2, o *SAR* e o *ILP* são propriedades características de um dado material magnético e revelam a capacidade desse material magnético gerar calor. Para a utilização das mNPs em tratamentos tumorais por hipertermia, é conveniente fazer uma análise acerca das potencialidades magnéticas deste material.

Assim, todas as mNPs produzidas neste trabalho foram submetidas a ensaios de hipertermia que possibilitassem o cálculo do *SAR* e *ILP*. O objetivo foi o de determinar a influência, quer dos tensioativos e do revestimento de Cs, quer do processo de liofilização, na capacidade que as mNPs têm de gerar calor.

Os ensaios foram realizados para um intervalo de tempo de 10 minutos e uma intensidade de campo magnético de 300 Gauss. Relativamente à frequência do campo magnético aplicado, esta foi a máxima permitida pelo equipamento: 418,5 Hz.

O *SAR* e o *ILP* são então complementares para avaliar estas características. Como o *SAR* depende da intensidade e frequência do campo magnético aplicado, impossibilita a comparação entre experiências entre diferentes equipamentos, devido à variação destes parâmetros. Já o *ILP* é independente das condições experimentais, permitindo então essa comparação.

Estes foram calculados utilizando a equação 1 e 2, enunciadas no capítulo 2. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3: Valores de *SAR* e *ILP* obtidos, através de ensaios de hipertermia, para as mNPs produzidas neste trabalho.

Tipo de mNPs	Revestimento	Liofilização	<i>SAR</i> (W/g)	<i>ILP</i> (nH.m ² /kg)
Sem Tensioativo	-	✖	127 ± 6	0,531 ± 0,025
	Cs	✖	70 ± 7	0,293 ± 0,030
		✓	60 ± 8	0,253 ± 0,034
Citrato de Sódio	-	✖	45 ± 3	0,189 ± 0,014
	Cs	✖	36 ± 5	0,150 ± 0,020
		✓	23 ± 6	0,145 ± 0,023
Ácido Oleico	-	✖	14 ± 6	0,059 ± 0,024
	Cs	✖	10 ± 6	0,043 ± 0,023
		✓	5 ± 3	0,021 ± 0,012

Numa primeira análise da tabela 5.3, focada apenas nas mNPs sem revestimento estabelece-se uma comparação entre os valores obtidos para as mNPs com e sem tensioativo, verificando-se assim que a presença de tensioativo influencia os valores de *SAR* e *ILP*, ou seja, influencia as propriedades magnéticas das nanopartículas e a sua capacidade para gerarem calor. Um valor máximo de *SAR* e *ILP* é atribuído às mNPs sem tensioativo. Esse valor é reduzido na presença do CT e AO, verificando-se que as mNPs com AO são aquelas com menor valor de *SAR* e *ILP*.

O mesmo se pode concluir quando as mNPs são revestidas com Cs. Para as mesmas mNPs, comparando os valores com e sem revestimento, verifica-se que a presença do Cs também afeta as propriedades magnéticas das mNPs, pela diminuição do valor de *SAR* e *ILP*.

Este resultado era expectável, na medida em que quer os tensioativos, quer o quitosano, estão ligados à superfície das mNPs, funcionando como uma espécie de barreira, podendo levar a uma diminuição da suscetibilidade magnética das mNPs. Em particular o AO, como já referido, devido à sua elevada concentração nas mNPs (64mM) forma uma bicamada na superfície das mesmas. Outra possível causa é a hipótese de os revestimentos absorverem parte do calor gerado pelas mNPs. Além disso, como o calor é gerado pelos movimentos das mNPs, este efeito redutor na presença do Cs, pode ser justificado pela formação da rede polimérica envolta nas mNPs, provocando o aprisionamento das mNPs nesta rede. Assim limita os movimentos das mNPs e, consequentemente, a capacidade de produzir calor [31].

Relativamente à liofilização, também se pode concluir que este processo afeta as propriedades magnéticas das nanopartículas, sendo a situação onde se obtém os valores de *SAR* e *ILP* mais baixos para os diferentes tipos de mNPs. Uma justificação possível prende-se com o facto de o Cs nesta situação não estar previamente em solução, ou seja, não está inchado, formando uma rede mais compacta à volta das mNPs. Esta rede, já descrita em cima, irá limitar ainda mais os movimentos das mNPs, do que sem liofilização, em que o Cs se encontra em solução, ou seja, inchado.

Além disso, o processo de secagem das mNPs por si só pode afetar as propriedades magnéticas das mesmas. Embora a redispersão das mNPs em meio aquoso seja possível após a liofilização, há a possibilidade de se formarem agregados de partículas irreversíveis. Estes agregados comprometem as propriedades magnéticas das nanopartículas que são conferidas, em parte, pelas suas pequenas dimensões. Outra possível causa é uma alteração na estrutura das partículas, provocada pela cristalização induzida pelas baixas temperaturas de liofilização, podendo levar a uma destabilização das mesmas. Uma possível solução é a adição de agentes estabilizadores na superfície das mNPs, como enunciado na literatura, que estabelecem ligações às mNPs por pontes de hidrogénio e evitam que estas se agreguem ou se danifiquem durante o processo de liofilização. [60].

Os valores de *ILP* obtidos neste trabalho, comparativamente aos já relatados na literatura, são inferiores. *Kossatz et al*, em 2014, obtiveram valores de *ILP* 8.7 ± 0.2 nH.m²/Kg para mNPs de óxido de ferro produzidas por co precipitação e valores de *ILP* de 6.4 ± 0.5 nH.m²/Kg para mNPs produzidas por um método orgânico [63]. Em 2009, testes feitos a mNPs comercializadas revelaram valores de *ILP* que variam entre 0,37 nH.m²/Kg, para diâmetros hidrodinâmicos de 346 nm, e 3,1 nH.m²/Kg, para diâmetros hidrodinâmicos de 91 nm. Verifica-se assim uma dependência do valor de *ILP* relativamente ao diâmetro hidrodinâmico das mNPs [20]. No entanto, a comparação de valores de *ILP* entre este trabalho e a literatura não é simples visto que, apesar deste valor ser independente da frequência e intensidade do campo magnético, depende da quantidade de amostra utilizada assim como da concentração das mNPs em suspensão. Para uma comparação mais rigorosa, seria necessário igualar estas grandezas nas diferentes experiências.

A aplicação da hipertermia no tratamento consiste no aumento da temperatura na zona do tumor até aos 43 °C, temperatura crítica para as células tumorais. A esta temperatura as células normais sobrevivem mas as células tumorais não (devido às características já enunciadas no capítulo 2).

Com isto, é necessário que as mNPs atinjam esta temperatura (43 °C) quando sujeitas à aplicação do campo magnético externo, em hipertermia. Para tal, foram realizados ensaios de hipertermia em todos os tipos de mNPs produzidas para diferentes concentrações, de forma a determinar, para as diferentes mNPs, quais as concentrações que atingem e, se atingem, esta temperatura num intervalo de tempo máximo de 10 min (tempo estudado para aplicação do campo magnético). Nas situações em que a temperatura foi efetivamente atingida, foi calculado o intervalo de tempo necessário de aplicação do campo. Os ensaios foram realizados com os parâmetros já descritos acima e com uma temperatura inicial de 25 °C. No entanto, na aplicação *in vivo*, a temperatura inicial seria de 37 °C. Assim sendo, nestes ensaios, foram contabilizadas as mNPs com capacidade de aquecimento de 6 °C, de forma a prever uma situação *in vivo*, para atingirem os 43 °C

Na Tabela 5.4 estão representados os resultados obtidos com a respetiva conversão necessária para de verificar um aumento de temperatura de 37 para 43 °C.

Pela análise da Tabela 5.4 é possível verificar que a temperatura necessária para matar as células tumorais (43 °C) não é atingida com a utilização de todos os tipos de mNPs, nas concentrações testadas. Isto significa que nem todas as mNPs produzidas se revelam eficientes para aplicações em hipertermia magnética, em ensaios com estas características. Ou então teriam de ser utilizadas concentrações de mNPs muito elevadas, que podem não ser toleradas pelo organismo. Um aumento do tempo de aplicação de campo poderia ser uma solução para elevar a temperatura atingida.

Enquanto as mNPs de AO não atingem a temperatura desejada para nenhuma concentração utilizada, todas as mNPs sem tensioativo, assim como as de CT atingiram esta temperatura. É possível verificar que o tempo necessário para tal não é sempre o mesmo. A presença do Cs, assim como da liofilização levam a um aumento do tempo necessário para atingir os 43 °C.

Assim, foi utilizada uma concentração de 5 mg/ml para os testes de hipertermia realizados em culturas celulares com mNPs, de forma a garantir que seriam atingidos os 43 °C no menor intervalo de tempo possível. As mNPs selecionadas para esses ensaios foram as mNPs sem tensioativo e sem Cs, visto terem revelado melhor capacidade de aquecimento.

Tabela 5.4: Resultados da aplicação da hipertermia em diferentes mNPs e com diferentes concentrações, para atingir 43°C. O ✓ indica que as mNPs atingiram os 43°C para aquelas concentrações e o ✕ indica que não atingiram.

mNPs de Fe ₃ O ₄			[Nps]/(mg/ml) que atingiram os 43 °C					Δt mínimo necessário para os 43 °C (min)
Tensioativo	Revesti-mento	Liofiliza-das	1	2	3	4	5	
Nenhum	-	Não	✓					1
	Cs	Não	✕		✓			2
		Sim	✕		✓			2
CT	-	Não	✕		✓			2
	Cs	Não	✕		✓			3
		Sim	✕		✓			5
AO	-	Não	✕					Não atingem os 43 °C em 10 min
	Cs	Não	✕					
		Sim	✕					

5.6. Citotoxicidade das mNPs

Foram realizados ensaios de citotoxicidade para todos os tipos de mNPs produzidos. O objetivo destes ensaios foi de determinar a concentração máxima para a qual as mNPs não se revelam citotóxicas, assim como a influência dos tensioativos e do revestimento com Cs na citotoxicidade. Para tal foram utilizadas culturas de células de duas linhagens diferentes, fibroblastos (Vero) e osteoblastos (Saos-2).

Estes ensaios foram realizados em placas de 96 poços, com 5000 células por poço (5000 células/100 µl). O método utilizado para a determinação da viabilidade celular foi o método direto, em que as mNPs foram colocadas em contacto com as células. Os resultados foram obtidos pela medição da absorvância do conteúdo das placas a 570 e 600 nm.

Na Figura 5.13 é apresentado o resultado dos ensaios de citotoxicidade para as mNPs sem Cs, ou seja, a viabilidade celular em função da concentração de mNPs.

Pela análise da citotoxicidade nos fibroblastos, Figura 5.13 a), verifica-se, como esperado, uma diminuição da viabilidade celular para um aumento da concentração das mNPs. Para as mNPs

sem tensoativos verifica-se que existe uma citotoxicidade moderada, mesmo para as concentrações mais baixas, não sendo apresentados indícios de citotoxicidade severa para estas mNPs, nas concentrações estudadas.

Para as mNPs com tensoativos, não se verifica existência de citotoxicidade para as concentrações de 0,03 e 0,06 mg/ml. Para concentrações superiores já é verificada uma ligeira, seguida de severa citotoxicidade. A influência dos tensoativos é verificada, essencialmente para as concentrações mais elevadas de mNPs, levando a uma diminuição significativa da viabilidade celular na presença dos mesmos. Aqui não é verificada diferença entre os efeitos do CT e AO, comparados entre si.

Relativamente à citotoxicidade nos osteoblastos, Figura 5.13 b), os resultados de citotoxicidade e a influência dos tensoativos são semelhantes aos descritos para fibroblastos, verificando-se apenas uma ligeira redução da viabilidade celular, para todas as concentrações em geral.

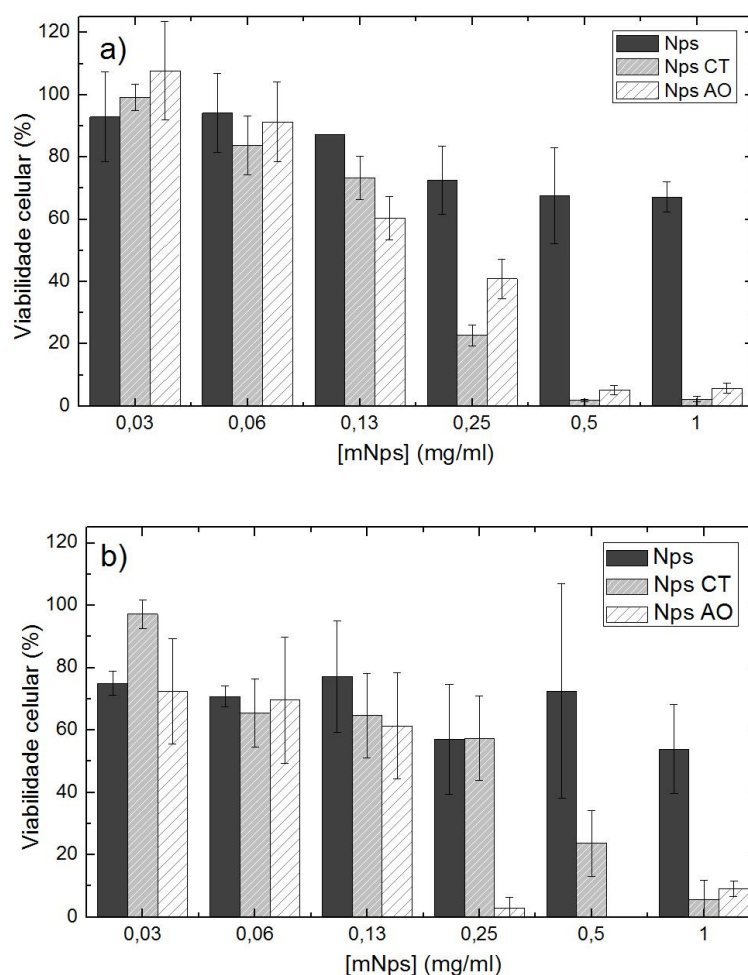


Figura 5.13: Viabilidade celular em função da concentração de mNPs sem tensoativo (Nps), mNPs de Citrato de Sódio (Nps CT) e mNPs de Ácido Oleico (Nps AO), para células a) Vero e b) Saos-2.

Salienta-se ainda a possibilidade de terem ocorrido erros durante estes ensaios, devido à elevada sensibilidade dos mesmos. Durante este trabalho existiram algumas contaminações das culturas celulares e das soluções utilizadas. A forma com as células são semeadas nos poços também pode levar a variações nas quantidades de células em cada poço. A dificuldade em retirar as mNPs dos poços levou a múltiplas lavagens com PBS, que podem levar à remoção ou morte das células existentes nos poços. A junção destes possíveis percalços pode levar a resultados nem sempre coerentes e conclusivos.

Na Figura 5.14 é apresentado o resultado dos ensaios de citotoxicidade para as mNPs com Cs.

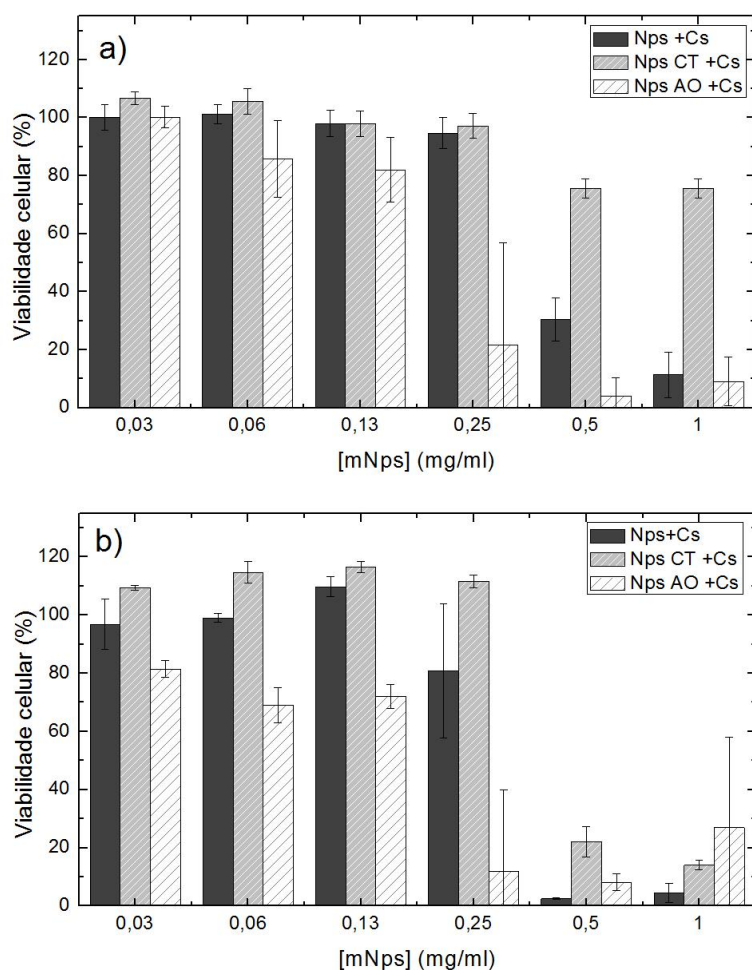


Figura 5.14: Viabilidade celular para as mNPs com Cs, em função da concentração de mNPs sem tensioativo (Nps+Cs), mNPs de Citrato de Sódio (Nps CT+Cs) e mNPs de Ácido Oleico (Nps AO+Cs), para células a) Vero e b) Saos-2.

Numa primeira análise é visível que, comparativamente aos ensaios realizados sem Cs, estes apresentam uma viabilidade celular superior, tanto para os fibroblastos como para os osteoblastos. Este resultado é indicativo de uma menor citotoxicidade das mNPs no organismo, quando

revestidas com Cs. Uma outra análise permite verificar que para concentrações inferiores a 0,25 mg/ml, não é verificada citotoxicidade nas mNPs simples com Cs e nas mNPs de CT, com Cs, em ambas as culturas celulares. Aqui, a presença do AO leva a uma menor viabilidade celular, comparativamente às restantes mNPs, assim como a uma maior citotoxicidade para concentrações mais baixas. Relativamente à citotoxicidade para as mNPs simples e as mNPs revestidas com CT não se verificam diferenças significativas. Por fim, entre os fibroblastos e os osteoblastos só se verificam diferenças de resultados na presença de AO, revelando maior citotoxicidade para os osteoblastos.

Os possíveis erros referidos em cima também se aplicam a estes ensaios, podendo levar à adulteração involuntária dos resultados.

5.6.1. Citotoxicidade celular em hipertermia

Foram realizados ensaios celulares, sujeitando as células com mNPs a ensaios de hipertermia. O campo magnético foi aplicado apenas até ser atingida uma temperatura de 43°C, interrompendo a experiência quando esta temperatura foi alcançada, pois para temperaturas superiores, poderia ocorrer morte celular, não pela aplicação da hipertermia mas sim por sujeitar as células a temperaturas demasiado elevadas.

As condições para a realização destes ensaios não foram ideais, visto que a incubadora onde estão as células não se encontra próxima do equipamento de hipertermia, sujeitando as células a uma mudança de atmosfera, fator impactante na sobrevivência celular. Além disso existiu a exposição direta das células a um ambiente não estéril, embora evitada sempre a experiência o permitisse. Para estes ensaios foi testada previamente a adesão das células aos tubos de hipertermia, que se verificou bem-sucedida.

Na Figura 5.15 estão apresentados os resultados de citotoxicidade com a aplicação de hipertermia magnética. Foram realizados alguns controlos, todos eles sujeitos aos mesmos tempos fora da incubadora e à presença da atmosfera não estéril, nas mesmas circunstâncias. No entanto, para o controlo de células e controlo de mNPs não se realizaram ensaios de hipertermia. O primeiro contém apenas células e o segundo contém células e as mNPs, na mesma concentração usada em hipertermia. Este controlo de nanopartículas serve para verificar o grau de citotoxicidade celular associado apenas à presença das mNPs nas células, de forma a podermos ter em conta esse efeito no resultado final de citotoxicidade dos ensaios em hipertermia. Por fim, o controlo de hipertermia contém apenas células e foi utilizado para controlar o efeito da aplicação da hipertermia apenas nas células, na ausência das mNPs. Após os ensaios as mNPs foram retiradas das células, para o efeito da sua citotoxicidade não se acentuar durante as 24 horas seguintes.

Começando pela análise dos fibroblastos, Figura 5.15 a) verifica-se que, antes da aplicação da hipertermia a viabilidade celular era de aproximadamente 100% em todos os frascos. 24 horas após a aplicação da hipertermia o controlo de hipertermia permaneceu com uma viabilidade celular acima dos 80%, podendo indicar que não existem efeitos celulares da aplicação de um campo magnético, por si só. Analisando então o efeito da aplicação da hipertermia a células com mNPs (representado no gráfico por Nps) verifica-se uma viabilidade celular média de 30% com um desvio associado de 10%. No entanto, é necessário também contabilizar a influência da presença das mNPs nas células. Para isso, analisa-se o controlo de mNPs e verifica-se que este apresenta uma viabilidade celular de $[45 \pm 5] \%$. Assim, pelos valores obtidos e, os desvios significativos, não se pode atribuir diretamente nenhum efeito da aplicação de hipertermia até uma temperatura máxima de 43 °C para os fibroblastos.

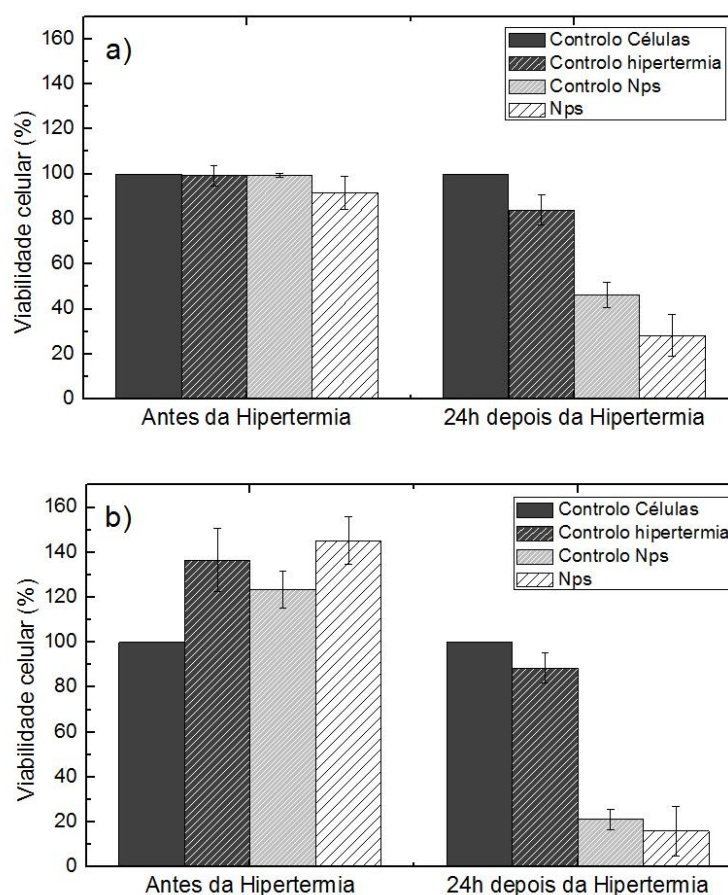


Figura 5.15: Viabilidade celular antes e depois dos ensaios de hipertermia com uma proporção de 5 mg de Nps para 40 000 células, para células a) Vero e b) Saos-2.

Relativamente à Figura 5.15 b) verifica-se uns valores iniciais de viabilidade celular superiores a 100%. Isto pode ser justificado por um crescimento maior das células nos restantes frascos,

comparativamente às do controlo de células, ou então pode ter havido uma distribuição de células desigual pelos diferentes frascos, o que pode acontecer facilmente, como já foi referido. Contudo, tecendo as comparações entre os valores antes e após da aplicação em hipertermia, verifica-se que para os osteoblastos, existe efetivamente um impacto negativo na viabilidade celular com a aplicação de hipertermia. Começando pelo controlo de hipertermia, é possível verificar que a aplicação do campo magnético nestas células (sem presença de mNPs, logo sem aumento da temperatura) levou a uma diminuição de cerca de 40% da viabilidade celular associada apenas aos efeitos da aplicação do campo magnético. Relativamente aos efeitos celulares da hipertermia na presença de mNPs, ou seja, ao aumento de temperatura até aos 43°C não se pode afirmar nada pois apesar de ter sido verificada uma redução muito elevada da viabilidade celular após a aplicação da hipertermia, também foi verificada uma elevada diminuição da viabilidade celular associada apenas à presença das mNPs nas células. Assim sendo, não é possível afirmar com segurança que existiu uma viabilidade celular significativa com o aumento da temperatura das células dos osteoclastos, por aplicação da hipertermia.

6. Conclusão e perspectivas futuras

Finalizado o trabalho, é possível tecer algumas considerações finais acerca do mesmo, assim como sugestões para trabalhos futuros, de forma a complementar os estudos aqui efetuados.

O objetivo deste trabalho passava por estudar a liberação controlada de fármaco para aplicação em hipertermia magnética, assim como a influência dos tensioativos e do quitosano no revestimento das mNPs. Para tal, efetuou-se uma despolimerização do quitosano existente em laboratório, a produção de mNPs de óxido de ferro simples e com dois tensioativos e o seu revestimento com quitosano. Concluída esta etapa, aplicou-se estas mNPs em estudos de liberação de fármaco em meios com diferentes valores de pH, assim como em ensaios de hipertermia para o cálculo do *SAR* e *ILP*. Por fim, foram realizados ensaios de citotoxicidade quer das mNPs, quer da aplicação de hipertermia, em duas culturas celulares diferentes.

Relativamente à despolimerização do quitosano, foi obtido um resultado final dentro do valor esperado (28 KDa) para a sua aplicação neste trabalho.

A precipitação química, método utilizado para a produção de mNPs de Fe_3O_4 , revelou-se eficiente obtendo-se mNPs com concentrações elevadas (cerca de 30 mg/ml). Estas foram caracterizadas por TEM, o que revelou um tamanho médio das mNPs de $[8 \pm 2]$ nm e a existência de alguns agregados entre elas, o que era esperado devido à tendência natural que as mNPs têm para se agregar na ausência de um agente estabilizante. As dimensões obtidas para o núcleo das mNPs (<100 nm) são de grande interesse para aplicação no tratamento do cancro, pois com estas dimensões, têm propriedades superparamagnéticas, permitem que as nanopartículas circulem na corrente sanguínea e se acumulem nas zonas tumorais.

Quanto aos tensioativos estudados, CT e AO, as caracterizações por FTIR e TGA mostraram que estes se ligaram, efetivamente, à superfície das mNPs, indicando ainda a presença de uma bicamada de AO, consequência da elevada concentração usada (64 mM). A ligação do Cs à

superfície da nanopartícula também se verificou para todos os tipos de nanopartículas (com e sem tensioativo). Dado o interesse biomédico destas mNPs, sugere-se, em trabalhos futuros, o estudo da utilização destas mNPs em diferentes aplicações, por exemplo, como agentes de contraste em ressonância magnética.

Os estudos de encapsulamento da Dox nas mNPs revelaram a existência de uma concentração de saturação, a partir da qual as mNPs já não têm capacidade de encapsular mais Dox, assim como valores de EE próximos de 100% para as mNPs sem tensioativo e com CT. Relativamente à influência dos tensioativos na EE, verifica-se que apenas o AO tem influência, dado que a EE máxima obtida na sua presença é significativamente mais baixa (57%). Este facto pode ser justificado pela formação da dupla camada de AO, impedindo a penetração da Dox na nanopartícula. Como a concentração de AO estudada se mostra eficaz para a sua função como tensioativo (verificado por A. Alves [49] em trabalhos anteriores), pode-se sugerir, em trabalhos futuros, manter esta concentração e estudar o encapsulamento da Dox antes da adição do AO, de forma a evitar a ação da bicamada na EE. Relativamente ao revestimento com Cs, foram obtidos valores máximos de EE de aproximadamente 90% e uma anulação dos efeitos verificados anteriormente para o AO na ausência de Cs, levando à possibilidade de a Dox estar encapsulada na rede de Cs e não no núcleo de Fe_3O_4 .

Os ensaios de libertação de Dox, recorrendo a mNPs, revelam uma sensibilidade ao pH do meio de libertação, verificando-se libertações mais altas em meios com pH ácido. Este resultado sugere a libertação de Dox acoplada às mNPs como uma boa aposta no tratamento do cancro, visto que a libertação no pH dos lisossomas e do meio extracelular tumoral é significativamente mais elevada, comparativamente à libertação no pH da corrente sanguínea. Verificou-se, também, que existe uma libertação de Dox inicial muito rápida, atingindo um patamar de libertação ao fim de 12h, para os ensaios sem liofilização. Quando liofilizadas, as mNPs têm uma libertação inicial mais lenta, onde o patamar de libertação nunca é atingido antes das 24h. Assim, o processo de liofilização, para além das vantagens na conservação das mNPs ao longo do tempo, apresenta também um modelo de libertação mais controlado.

Com os ensaios de hipertermia, verificou-se que a presença dos tensioativos (especialmente o AO), assim como do revestimento de Cs e do processo de liofilização, reduz o valor de SAR e ILP, ou seja, diminui a capacidade que as mNPs têm de gerar calor.

Os ensaios de hipertermia permitiram, ainda, verificar qual a concentração das mNPs e o tempo médio de aplicação de um campo magnético (com a frequência e intensidade utilizada neste trabalho) necessários para atingir 43 °C. Aqui verificou-se que, por um lado, na presença do AO esta temperatura não é atingida, mesmo para concentrações mais altas de mNPs. Por outro, a presença do CT, o revestimento com Cs ou o processo de liofilização atrasam este processo. Assim, pode-se concluir que para aplicação em hipertermia magnética no tratamento tumoral,

apenas as mNPs sem nenhum tensioativo e com CT se revelaram eficazes para estas concentrações, pois são as únicas que atingem a temperatura à qual as células tumorais morrem. Um aumento da concentração das mNPs pode levar a atingir a temperatura desejada, no entanto, é necessário considerar o facto de que elevadas concentrações de mNPs nas células podem ter efeitos citotóxicos severos.

Os ensaios de citotoxicidade revelaram, de uma forma geral, citotoxicidade elevada para concentrações de mNPs acima dos 0,25 mg/ml. Contudo, para concentrações inferiores a 0,13mg/ml, nenhuma das mNPs utilizadas revelam valores críticos de citotoxicidade. Aqui não é possível afirmar a existência de influência dos tensioativos, dada a heterogeneidade dos resultados obtidos. Relativamente à influência do revestimento com Cs, verifica-se, para alguns casos, valores de viabilidade celular superiores na presença do Cs, assim como concentrações mais elevadas, a partir das quais as mNPs se revelam citotóxicas. Estes dados são indicativos de um efeito positivo na viabilidade celular devido à ação do Cs. Devido à heterogeneidade dos resultados obtidos, sugere-se, em trabalhos futuros, um estudo mais aprofundado da citotoxicidade, envolvendo a preparação de mNPs num meio estéril, ou então o tratamento das mesmas, antes da realização dos ensaios de citotoxicidade.

Relativamente à citotoxicidade com a aplicação de hipertermia, pode-se concluir que os osteoblastos apresentam uma menor viabilidade celular após aplicação do campo magnético em hipertermia, comparativamente aos fibroblastos. Estes resultados vão de encontro ao esperado, visto que os osteoblastos são uma linha celular derivada de um tumor (osteossarcoma), apresentando assim maior sensibilidade. As condições em que os ensaios foram realizados, leva à possibilidade de resultados influenciados por fatores externos à experiência, tal como descrito anteriormente.

Neste trabalho foram ainda iniciados ensaios com o objetivo de determinar o valor do DL₅₀ do fármaco, em culturas celulares. No entanto, contaminações sucessivas dessas culturas, geradas por fatores externos ao trabalho, impossibilitaram a conclusão destes ensaios. Assim, sugere-se, como trabalho futuro, a conclusão destes ensaios, assim como ensaios de citotoxicidade das mNPs encapsuladas com Dox. Torna-se também pertinente o estudo da entrada das mNPs nas células e a sua permanência nas mesmas.

Concluído o estudo da influência do pH na libertação de fármaco acoplado a mNPs, torna-se pertinente sugerir, como trabalho futuro, a aplicação da hipertermia magnética à libertação de fármacos. Para tal, sugere-se a realização dos ensaios de libertação em hipertermia magnética, com o objetivo de verificar, simultaneamente, a influência da aplicação do campo magnético e do aumento de temperatura no modelo de libertação. Esta situação alia o interesse clínico da hipertermia à libertação de fármaco, no tratamento do cancro.

7. Referências

- [1] “Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.” .
- [2] P. Pinheiro, J. Tyczynski, F. Bray, J. Amado, E. Matos, and D. Parkin, “Cancer incidence and mortality in Portugal,” *European Journal of Cancer*, vol. 39, pp. 2507–2520, 2003.
- [3] P. Soares, I. Ferreira, and J. Borges, “Application of Hyperthermia for Cancer Treatment: Recent Patents Review,” in *Topics in Anti-Cancer Research*, vol. 3, 2014, pp. 3–44.
- [4] B. Hildebrandt, P. Wust, O. Ahlers, A. Dieing, G. Sreenivasa, T. Kerner, R. Felix, and H. Riess, “The cellular and molecular basis of hyperthermia.,” *Critical reviews in oncology/hematology*, vol. 43, pp. 33–56, 2002.
- [5] A. K. Gupta and M. Gupta, “Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications.,” *Biomaterials*, vol. 26, pp. 3995–4021, 2005.
- [6] R. Hergt, R. Hiergeist, I. Hilger, W. . Kaiser, Y. Lapatnikov, S. Margel, and U. Richter, “Maghemite nanoparticles with very high AC-losses for application in RF-magnetic hyperthermia,” *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 270, pp. 345–357, 2004.
- [7] M. Ferrari, “Cancer nanotechnology: opportunities and challenges.,” *Nature reviews*, vol. 5, pp. 161–71, 2005.
- [8] A. Javid, S. Ahmadian, and S. Rezaei-zarchi, “Chitosan-Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Doxorubicin Delivery : Synthesis and Anticancer Effect Against Human Ovarian Cancer Cells,” *Chem Biol Drug Des*, vol. 82, pp. 296–306, 2013.
- [9] M. Dan, D. F. Scott, P. A. Hardy, R. J. Wydra, J. Z. Hilt, R. A. Yokel, and Y. Bae, “Block Copolymer Cross-Linked Nanoassemblies Improve Particle Stability and Biocompatibility of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles,” *Pharm Res*, vol. 30, pp. 552–561, 2013.

- [10] A. M. Kruse, S. A. Meenach, K. W. Anderson, and J. Z. Hilt, "Synthesis and characterization of CREKA-conjugated iron oxide nanoparticles for hyperthermia applications," *Acta Biomaterialia*, vol. 10, pp. 2622–2629, 2014.
- [11] M. G. Harisinghani, J. Barentsz, P. F. Hahn, W. M. Deserno, S. Tabatabaei, and R. Weissleder, "Noninvasive Detection of Clinically Occult Lymph-Node Metastases in Prostate Cancer," *The New England Journal of Medicine*, vol. 19, pp. 2491–2499, 2003.
- [12] O. S. Nielsen, M. Horsman, and J. Overgaard, "A future for hyperthermia in cancer treatment?," *European Journal of Cancer*, vol. 37, pp. 1587–1589, 2001.
- [13] E. Kita, T. Oda, T. Kayano, S. Sato, M. Minagawa, H. Yanagihara, M. Kishimoto, C. Mitsumata, S. Hashimoto, K. Yamada, and N. Ohkohchi, "Ferromagnetic nanoparticles for magnetic hyperthermia and thermoablation therapy," *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 43, pp. 474011–474020, 2010.
- [14] R. D. Issels, J. Mittermüller, A. Gerl, W. Simon, A. Ortmaier, C. Denzlinger, H. Sauer, and W. Wilmanns, "Improvement of local control by regional hyperthermia combined with systemic chemotherapy (ifosfamide plus etoposide) in advanced sarcomas: updated report on 65 patients.," *Journal of cancer research and clinical oncology*, vol. 117, pp. 141–147, 1991.
- [15] S. Wada, L. Yue, K. Tazawa, I. Furuta, H. Nagae, S. Takemori, and T. Minamimura, "New local hyperthermia using dextran magnetite complex (DM) for oral cavity: experimental study in," *Oral Diseases*, vol. 7, pp. 192–195, 2001.
- [16] C. S. S. R. Kumar and F. Mohammad, "Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery.," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 63, pp. 789–808, 2011.
- [17] J. Otte, "Hyperthermia in cancer therapy," *European Journal of Pediatrics*, vol. 147, pp. 560–569, 1988.
- [18] J. M. Larkin, "A Clinical Investigation of Total-Body Hyperthermia as Cancer Therapy A Clinical Investigation of Total-Body Hyperthermia as Cancer," *Cancer Res*, vol. 39, pp. 2252–2254, 1979.
- [19] M. D. Hurwitz, I. D. Kaplan, J. L. Hansen, S. Prokopios-Davos, G. P. Topulos, K. Wishnow, J. Manola, B. a Bornstein, and K. Hynynen, "Association of rectal toxicity with thermal dose parameters in treatment of locally advanced prostate cancer with radiation and hyperthermia.," *International journal of radiation oncology, biology, physics*, vol. 53, pp. 913–918, 2002.
- [20] M. Kallumadil, M. Tada, T. Nakagawa, M. Abe, P. Southern, and Q. a. Pankhurst, "Suitability of commercial colloids for magnetic hyperthermia," *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 321, pp. 1509–1513, 2009.
- [21] S. Purushotham and R. V. Ramanujan, "Thermoresponsive magnetic composite nanomaterials for multimodal cancer therapy," *Acta Biomaterialia*, vol. 6, pp. 502–510, 2010.
- [22] P. Vaupel, "Blood flow and metabolic microenvironment of brain tumors.," *Journal of Neuro-Oncology*, vol. 22, pp. 261–7, Jan. 1994.

- [23] M. Sincai, D. Ganga, M. Ganga, D. Argherie, and D. Bica, "Antitumor effect of magnetite nanoparticles in cat mammary adenocarcinoma," *Journal of magnetism and magnetic materials*, vol. 293, pp. 438–441, 2005.
- [24] S. Balivada, R. S. Rachakatla, H. Wang, T. N. Samarakoon, R. K. Dani, M. Pyle, F. O. Kroh, B. Walker, X. Leaym, O. B. Koper, M. Tamura, V. Chikan, S. H. Bossmann, and D. L. Troyer, "A / C magnetic hyperthermia of melanoma mediated by iron (0)/ iron oxide core / shell magnetic nanoparticles : a mouse study," *BMC Cancer*, vol. 10, pp. 1–9, 2010.
- [25] M. a. Phillips, M. L. Gran, and N. a. Peppas, "Targeted nanodelivery of drugs and diagnostics," *Nano Today*, vol. 5, pp. 143–159, 2010.
- [26] C. C. Berry, "Progress in functionalization of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine," *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 42, pp. 224003–224012, 2009.
- [27] Z. Lu, M. D. Prouty, Z. Guo, V. O. Golub, C. S. S. R. Kumar, and Y. M. Lvov, "Magnetic Switch of Permeability for Polyelectrolyte Microcapsules Embedded with Co @ Au Nanoparticles," *Langmuir*, vol. 21, pp. 2042–2050, 2005.
- [28] B. Thiesen and A. Jordan, "Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia," *Int. J. Hiperthermia*, vol. 24, pp. 467–474, 2008.
- [29] J. Lodhia, G. Mandarano, N. J. Ferris, P. Eu, and S. F. Cowell, "Development and use of iron oxide nanoparticles (Part 1): Synthesis of iron oxide nanoparticles for MRI," *Biomedical Imaging and Intervention Journal*, vol. 6, pp. 2–12, 2010.
- [30] A. M. G. C. Dias, A. Hussain, A. S. Marcos, and A. C. a Roque, "A biotechnological perspective on the application of iron oxide magnetic colloids modified with polysaccharides.," *Biotechnology advances*, vol. 29, pp. 142–155, 2011.
- [31] R. Hergt, S. Dutz, M. Robert, and M. Zeisberger, "Magnetic particle hyperthermia : nanoparticle magnetism and materials development for cancer therapy," *J. Phys.: Condens Matter*, vol. 18, pp. S2919–34, 2006.
- [32] T. Kobayashi, "Cancer hyperthermia using magnetic nanoparticles," *Biotechnology journal*, vol. 6, pp. 1342–1347, 2011.
- [33] F. Lochte, "Controlled synthesis of magnetic nanoparticles: Magnetic and thermal characterization for cancer theranostics," FCT-UNL, 2014.
- [34] M. Mahmoudi, S. Sant, B. Wang, S. Laurent, and T. Sen, "Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy.," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 63, pp. 24–46, 2011.
- [35] K. Yang, H. Peng, Y. Wen, and N. Li, "Re-examination of characteristic FTIR spectrum of secondary layer in bilayer oleic acid-coated Fe₃O₄ nanoparticles," *Applied Surface Science*, vol. 256, pp. 3093–3097, 2010.
- [36] M. Tejamaya, I. Römer, R. C. Merrifield, and J. R. Lead, "Stability of Citrate, PVP, and PEG Coated Silver Nanoparticles in Ecotoxicology Media.," *Environmental science & technology*, vol. 46, pp. 7011–7017, 2012.

- [37] S. H. Brewer, W. R. Glomm, M. C. Johnson, M. K. Knag, and S. Franzen, "Probing BSA Binding to Citrate-Coated Gold Nanoparticles and Surfaces.," *Langmuir*, vol. 21, pp. 9303–9307, 2005.
- [38] E. Khor, *Chitin: fulfilling a biomaterials promise*, Second edi. Elsevier, 2014.
- [39] Y. Xu and Y. Du, "Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles," *International journal of pharmaceutics*, vol. 250, pp. 215–226, 2003.
- [40] G. Y. Li, Y. R. Jiang, K. L. Huang, P. Ding, and J. Chen, "Preparation and properties of magnetic Fe₃O₄-chitosan nanoparticles," *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 466, pp. 451–456, 2008.
- [41] K. S. Soppimath, T. M. Aminabhavi, and A. R. Kulkarni, "Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices," *Journal of Controlled Release*, vol. 70, pp. 1–20, 2001.
- [42] B. A. M. Derfus, G. Von Maltzahn, T. J. Harris, T. Duza, K. S. Vecchio, E. Ruoslahti, and S. N. Bhatia, "Remotely Triggered Release from Magnetic Nanoparticles **," *Advanced Materials*, vol. 19, pp. 3932–3936, 2007.
- [43] M. R., "Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media," *IEEE Transactions on Magnetics*, vol. 17, pp. 1247–1248, 1981.
- [44] M. M. Lin, D. K. Kim, A. J. El Haj, and J. Dobson, "Development of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONS) for Translation to Clinical Applications," *IEEE Transactions on Nanobioscience*, vol. 7, pp. 298–305, 2008.
- [45] M. R. Kasaai, "Calculation of Mark-Houwink-Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent-temperature system using experimental reported viscometric constants data," *Carbohydrate Polymers*, vol. 68, pp. 477–488, 2007.
- [46] M. Talelli, C. J. F. Rijcken, T. Lammers, P. R. Seevinck, G. Storm, C. F. Van Nostrum, and W. E. Hennink, "Superparamagnetic iron oxide nanoparticles encapsulated in biodegradable thermosensitive polymeric micelles: Toward a targeted nanomedicine suitable for image-guided drug delivery," *Langmuir*, vol. 25, pp. 2060–2067, 2009.
- [47] S. Nigam, K. C. Barick, and D. Bahadur, "Development of citrate-stabilized Fe₃O₄ nanoparticles: Conjugation and release of doxorubicin for therapeutic applications," *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 323, pp. 237–243, 2011.
- [48] F. Li, H. Wu, H. Zhang, F. Li, C. H. Gu, and Q. Yang, "Antitumor drug Paclitaxel-loaded pH-sensitive nanoparticles targeting tumor extracellular pH," *Carbohydrate Polymers*, vol. 77, pp. 773–778, 2009.
- [49] A. M. R. Alves, "Desenvolvimento de nanopartículas magnéticas para tratamento de cancro : estudo da síntese e estabilização das soluções coloidais de Fe₃O₄," FCT-UNL, 2012.
- [50] E. J. Baran, "Spectroscopic investigation of the VO₂⁺/chitosan interaction," *Carbohydrate Polymers*, vol. 74, pp. 704–706, 2008.

- [51] P. I. P. Soares, A. M. R. Alves, L. C. J. Pereira, J. T. Coutinho, I. M. M. Ferreira, C. M. M. Novo, and J. P. M. R. Borges, "Effects of surfactants on the magnetic properties of iron oxide colloids," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 419, pp. 46–51, 2014.
- [52] Y. Wei, B. Han, X. Hu, Y. Lin, X. Wang, and X. Deng, "Synthesis of Fe₃O₄ nanoparticles and their magnetic properties," *Procedia Engineering*, vol. 27, pp. 632–637, 2012.
- [53] L. Qi, Z. Xu, X. Jiang, C. Hu, and X. Zou, "Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles," *Carbohydrate Research*, vol. 339, pp. 2693–2700, 2004.
- [54] H. Zhou, J. Lee, T. J. Park, S. J. Lee, J. Y. Park, and J. Lee, "Ultrasensitive DNA monitoring by Au–Fe₃O₄ nanocomplex," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 163, pp. 224–232, 2012.
- [55] Z. Li, L. Qiang, S. Zhong, H. Wang, and X. Cui, "Synthesis and characterization of monodisperse magnetic Fe₃O₄@BSA core–shell nanoparticles," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 436, pp. 1145–1151, 2013.
- [56] E. Taboada, G. Cabrera, R. Jimenez, and G. Cardenas, "A Kinetic Study of the Thermal Degradation of Chitosan-Metal Complexes," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 114, pp. 2043–2052, 2019.
- [57] F. a López, A. L. R. Ñ. Merc, and F. J. Alguacil, "A Kinetic Study on the Thermal Behaviour of Chitosan," *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol. 91, pp. 633–639, 2008.
- [58] G. Unsoy, R. Khodadust, S. Yalcin, P. Mutlu, and U. Gunduz, "Synthesis of Doxorubicin loaded magnetic chitosan nanoparticles for pH responsive targeted drug delivery," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 62, pp. 243–250, 2014.
- [59] A. Margaritis and B. Manocha, "Controlled Release of Doxorubicin from doxorubicin/y-Polyglutamic Acid Ionic Complex," *Journal of Nanomaterials*, vol. 2010, pp. 1–9, 2010.
- [60] A. Rampino, M. Borgogna, P. Blasi, B. Bellich, and A. Cesàro, "Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 455, pp. 219–228, 2013.
- [61] K. a Janes, M. P. Fresneau, A. Marazuela, A. Fabra, and M. J. Alonso, "Chitosan nanoparticles as delivery system for doxorubicin," *Journal of Controlled Release*, vol. 73, pp. 255–267, 2001.
- [62] F. M. Kievit, F. Y. Wang, C. Fang, H. Mok, K. Wang, J. R. Silber, R. G. Ellenbogen, and M. Zhang, "Doxorubicin loaded iron oxide nanoparticles overcome multidrug resistance in cancer in vitro," *Journal of Controlled Release*, vol. 152, pp. 76–83, 2011.
- [63] S. Kossatz, R. Ludwig, H. Dähring, V. Ettelt, G. Rimkus, M. Marciello, G. Salas, V. Patel, F. J. Teran, and I. Hilger, "High Therapeutic Efficiency of Magnetic Hyperthermia in Xenograft Models Achieved with Moderate Temperature Dosages in the Tumor Area," *Pharmaceutical Research*, vol. 31, pp. 3274–3288, 2014.

Apêndices

A – Análise termogravimétrica da Dox livre

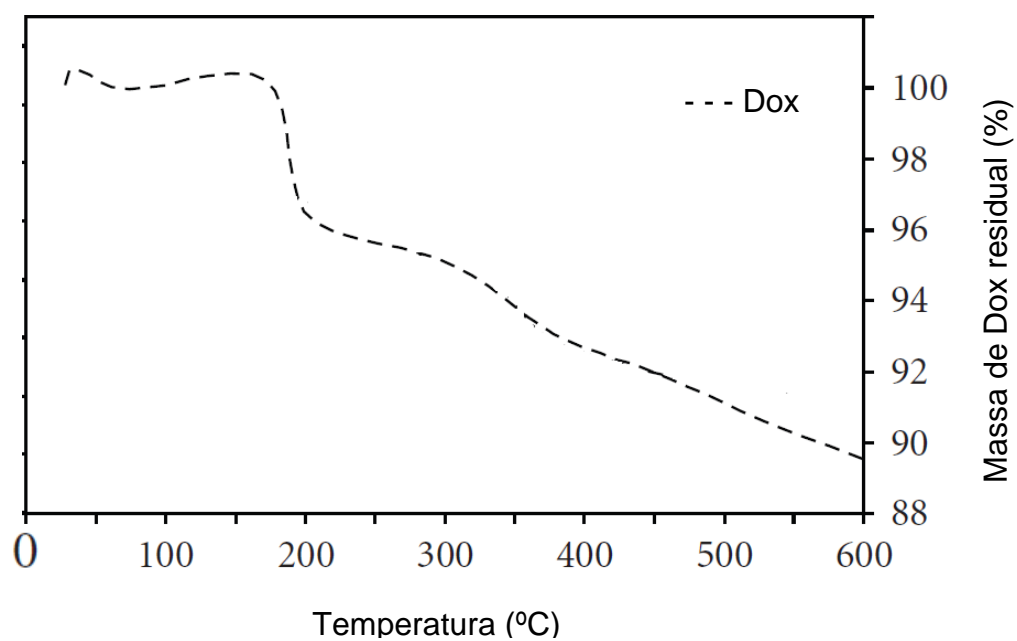


Figura 0.1: Análise termogravimétrica da Dox livre, obtido da bibliografia. (Adaptado de [59])

Analisando o termograma da Dox livre verifica-se que a maior perda de massa ocorre entre os 180 e 300 °C. Esta perda é devido ao ponto de fusão da Dox que foi determinado a 195 °C. Verifica-se também uma perda de massa total, a 600 °C, de apenas 10%.

B – Relação entre o pH e a percentagem de libertação de Dox para as mNPs com CT, AO, Cs e liofilizadas

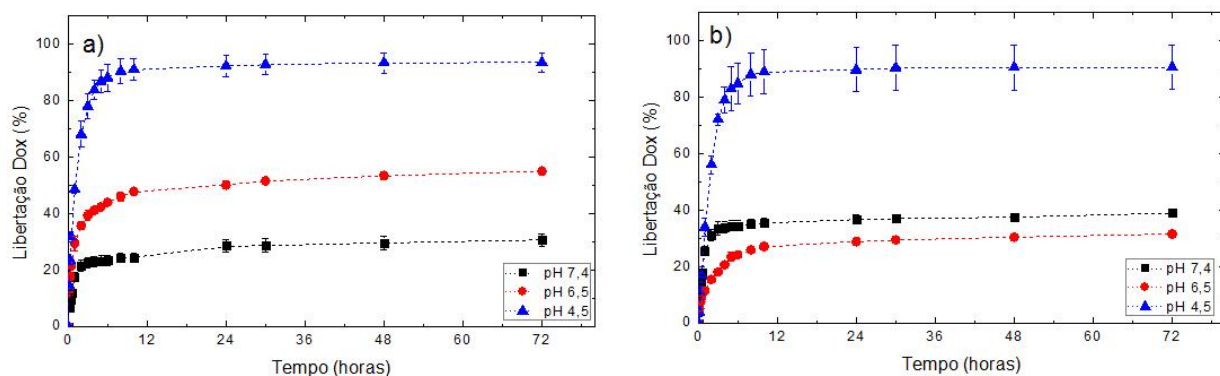


Figura 0.2: Libertação de Dox nos três pH para a) mNPs com CT e b) mNPs com AO

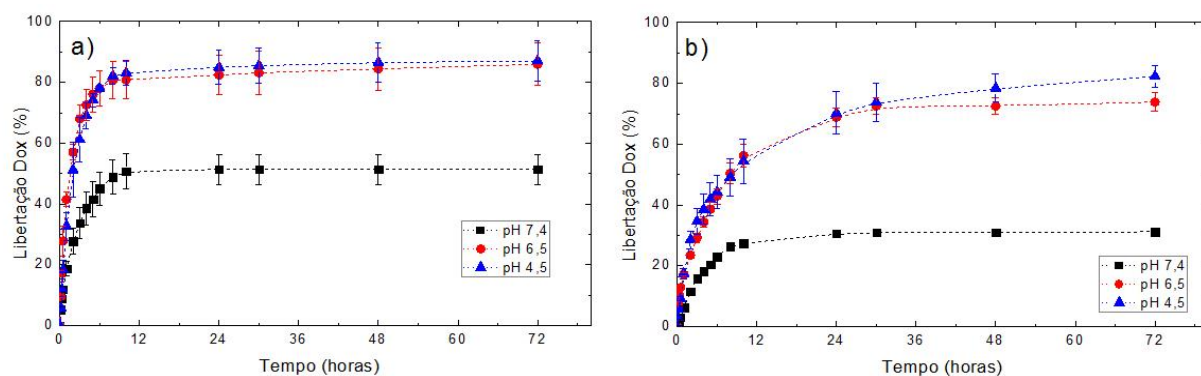


Figura 0.3: Libertação de Dox nos três pH para a) mNPs revestidas com Cs e b) mNPs liofilizadas.